F 1330

04

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 15

1972

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 1, p. 1—122, Bucureşti, martie, 1972

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Căsuţa poştală 134—135 (Calea Victoriei 126), Bucureşti, România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

ADRESA REDACŢIEI:
Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20
Sectorul I

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 15, nr. 1 1972

SUMAR

Pag.

C. BILAUS, E. NICOARĂ, C. BODEA, I. PETRESCU, Carotinoidele din crustaceul decapod *Xantho poressa* 5

L. BOTOŞENEANU, S. VASU, Ribonucleazele din formaţiunile seminţelor şi organele plantulelor de mazăre (*Pisum sativum*) 9

I. CORNOIU, Eliberarea aminoacizilor din biostructura frunzelor de grîu sub acţiunea azidei de sodiu 21

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, O nouă metodă de determinare cantitativă titrimetrică a alcaloizilor totali din planta *Chelidonium majus* L. 25

E. HADARAG, L. M. BURUIANĂ, Influenţa sărurilor de litiu asupra cineticii pirofosfatazei cerebrale 31

E. ILIESCU, Z. MARCU, Izoenzimele peroxidazice din mere, în timpul creşterii şi maturării lor 43

N. MIHALACHE, Evaluarea lichidelor extracelulare prin determinarea concomitentă a spaţiului de tiocianat şi glucoză. Studiu comparativ între normal şi diabetic 49

S. MIHĂESCU, V. GHEŢIE, Hidroliza imunoglobulinei G de iepure cu catepsină D purificată 55

R. OLINESCU, I. MĂRGINEANU, Studii asupra echilibrului SH $\rightleftharpoons$ SS în medii biologice. I. Reacţia dintre DTNB şi grupările SH ale proteinelor serice . . 63

F. POPESCU, V. GORCEA, Relaţia dintre piruvemie, piruvurie şi activitatea decarboxilazei piruvice din ficat şi creier la şobolani hrăniţi cu făinuri de extracţie diferită 73

E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN, R. LUPU, M. GRUIA, Efectul ATP-ului asupra activităţii lactat dehidrogenazei şi izoenzimelor sale în cursul multiplicării virusului herpetic 79

M. RABEGA, Activitatea L-asparaginazică în sucurile obţinute din frunze de porumb şi grîu tratate prin vacuum-infiltraţie cu inhibitori metabolici. . . 87

L. SCOLNIC, Influenţa ionului de potasiu asupra conţinutului în acid piruvic şi apă totală şi asupra exosmozei acidului piruvic din muşchiul sartorius de broască 93

R. STĂNESCU, Dozarea apei libere şi legate în ţesutul foliar, privită în lumina teoriei biostructurii 101

NOTE DE LABORATOR

V. GHEŢIE, H. D. SCHELL, Uscarea gelurilor perlate de agaroză 107

A. MIHĂESCU, Aminoacizii în sucul frunzelor de varză albă şi al fructelor de măr, neîncălzite şi preîncălzite la temperaturi diferite. 111

RECENZII 117

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 1, p. 1—122, Bucureşti, martie 1972

STUDII ȘI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tome 15, nr. 1 1972

MŰSZAKI KÖNYVTÁRES 1883

CONTENTS

Page

C. BILAUS, E. NICOARĂ, C. BODEA, I. PETRESCU, The carotenoids of the decapod crustacean *Xantho poressa* 5

L. BOTOȘENEANU, S. VASU, Ribonucleases in the seed formations and the organs of pea seedlings (*Pisum sativum*) 9

I. CORNOIU, The release of the amino acids from the biostructure of wheat leaves under the influence of sodium azide 21

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, A new method of titrimetric quantitative determination of total alkaloids in *Chelidonium majus* L. plant. . . . 25

E. HADARAG, L. M. BURUIANĂ, Influence of lithium salts on the kinetic pyrophosphatase activity of brain 31

E. ILIESCU, Z. MARCU, The isoperoxidases of apples during growth and maturation 43

N. MIHALACHE, Estimation of extracellular liquids by simultaneous determination of the thiocyanate and glucose space. Comparative investigation of normal and diabetic subjects 49

S. MIHĂESCU, V. GHEȚIE, Hydrolysis of rabbit immunoglobulin G by purified cathepsin D 55

R. OLINESCU, I. MĂRGINEANU, Studies on the SH $\rightleftharpoons$ SS equilibrium in biological media. I. The reaction between DTNB and SH groups of serum proteins. 63

F. POPESCU, V. GORCEA, Relation between pyruvic acid in blood and urine and pyruvate decarboxylase in the liver and brain in rats fed with various flours. 73

E. PRAHOVEANU, M. ȘERBAN, R. LUPU, M. GRUIA, The ATP effect upon lactate dehydrogenase activity and its isoenzymes in the course of herpetic virus multiplication 79

M. RABEGA, L-asparaginasic activity in saps of corn leaves treated by vacuum-infiltration with metabolic inhibitors 87

L. SCOLNIC, The effect of potassium ions upon acid and total water content, and upon pyruvic acid exosmosis from frog sartorius muscles. 93

R. STĂNESCU, The measurement of the free and bound water from the foliar tissues, in the light of the biostructure theory 101

LABORATORY NOTES

V. GHEȚIE, H. D. SCHELL, Drying of pearled agarose gels. 107

A. MIHĂESCU, The amino acids from white cabbage leaves and apple fruits, unheated and preheated at different temperatures 111

BOOK REVIEW 117

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 1, p. 1—122, București, martie, 1972

ST. CERC. BIOCHIM., 15 1, 5–8 (1972)

CAROTINOIDELE DIN CRUSTACEUL DECAPOD *XANTHO PORESSA*

CORINA BILAUS, ELENA NICOARĂ, C. BODEA* şi I. PETRESCU**

Rezumat. — S-au cercetat pigmenţii carotinoidici din crustaceul decapod *Xantho poressa*, diferenţiat pe organe, sexe şi vîrste (tineret şi adulţi). Ca pigmenţi principali au fost identificaţi astaxantina şi β-carotina, iar ca pigmenţi secundari xantofile şi 4-ceto-3',4'-dehidro-β-carotina. S-a constatat existenţa unei corelaţii între diferitele organe şi conţinutul în carotinoide precum şi o diferenţiere în funcţie de sex şi vîrstă.

Cercetări efectuate asupra cîtorva din cei mai răspîndiţi crustacei din Marea Neagră [1], [2], [3], ne-au permis să constatăm o distribuţie diferită a pigmenţilor carotinoidici atît pe organe cît şi în funcţie de sex.

În lucrarea de faţă ne-am propus să cercetăm carotinoidele din *Xantho poressa*, un alt crustaceu decapod cu largă răspîndire în Marea Neagră. Întrucît unele diferenţe sesizate în cercetările anterioare în conţinutul de carotinoide ar putea să se datoreze şi stadiilor de dezvoltare diferite în care se aflau crustaceii analizaţi, ne-am propus să efectuăm acest studiu diferenţiat nu numai pe organe şi sexe, ci şi pe vîrste (tineret şi adulţi).

MATERIAL ŞI METODE

Materialul cercetat constă din 23 indivizi masculi (8 adulţi şi 15 tineret) şi 16 femele (6 adulte şi 10 tineret) disecat în : hepatopancreas, pereiopod I, pereiopode II—V şi resturi corporale. Prelucrarea materialului biologic, identificarea şi dozarea carotinoidelor s-au făcut în acelaşi mod ca şi în lucrările anterioare [1], [2], [3].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pigmenţii identificaţi sînt, ca şi în cazul crustaceilor decapozi anterior analizaţi, astaxantina, β-carotina, xantofile, iar ca pigment cetonic în locul cantaxantinei care aici n-a fost pusă în evidenţă, apare 4-ceto-3', 4'-dehidro-β-carotina. Ar fi posibil ca această carotinoidă să nu existe ca atare în crustaceul viu, ci să rezulte din 4-ceto-4'-hidroxi-β-carotină

* Pentru partea chimică.
** Pentru partea biologică.

în urma unei reacţii de eliminare de apă survenită în timpul păstrării şi prelucrării.

Conţinutul total în carotinoide este redat în tabela 1 iar raportul dintre diferitele carotinoide în tabela 2.

Tabela 1

Conţinutul în pigmenţi pe organe, sexe şi vîrste (mg/100 g s.u.)

Vîrsta	Hepatopancreas		Pereiopod I		Pereiopode II—V		Resturi corporale	
	♂ ♂	♀ ♀	♂ ♂	♀ ♀	♂ ♂	♀ ♀	♂ ♂	♀ ♀
Tineret	6,83	8,45	1,66	1,64	1,40	0,02	1,27	0,56
Adulţi	17,33	8,45	0,53	0,40	1,13	0,45	1,20	0,53

Tabela 2

Raportul între diferitele carotinoide la specia *Xantho poressa* în fracţiuni din întreg

Organul şi sexul	Pigmentul							
	β-carotină		4-ceto-3'-4'-dehidro		Astaxatină		Xantofile	
	adulţi	tineret	adulţi	tineret	adulţi	tineret	adulţi	tineret
Hepatopancreas	♂♂ 0,75	0,78	0,15	0,15	0,08	0,05	0,02	0,02
	♀♀ 0,85	0,85	0,10	0,10	0,03	0,03	0,02	0,02
Pereiopodul I	♂♂ 0,01	0,01	0,05	0,05	0,87	0,89	0,07	0,05
	♀♀ 0,01	0,01	0,05	0,05	0,82	0,87	0,12	0,07
Pereiopode II—V	♂♂ 0,05	0,05	—	—	0,85	0,85	0,10	0,10
	♀♀ 0,05	0,08	—	—	0,85	0,87	0,10	0,05
Resturi corporale	♂♂ urme		—	—	0,90	0,90	0,10	0,10
	♀♀ urme		—	—	0,90	0,90	0,10	0,10

Din date prezentate reies următoarele:

Hepatopancreasul este organul cel mai bogat în pigmenţi. La indivizii masculi conţinutul în pigmenţi al hepatopancreasului este mult mai mare la adulţi decît la tineret, pe cînd la femele este acelaşi la ambele vîrste. Deci la indivizii masculi o dată cu creşterea are loc o sporire a conţinutului de carotinoide în hepatopancreas, ceea ce la femele nu se observă. Acest fapt ar putea fi corelat cu ovogeneza cînd o parte din pigmentul acumulat în hepatopancreasul femelelor mature ar migra spre ouă, lucru semnalat atît de Gilchrist în *Anostraca* [4], cît şi de noi în *Pachygrapsus marmoratus*.

În ceea ce priveşte raportul dintre carotinoidele existente în acest organ, se remarcă şi aici, ca şi la crustaceii anterior analizaţi, predominanţa β-carotinei, care este mai accentuată la femele atît în cazul exemplarelor adulte, cît şi în cazul tineretului.

Al doilea pigment în ce privește raportul de participare este 4-ceto-3′,4′-dehidro-β-carotina, mai bine reprezentată la indivizii masculi decît la femele atît la adulți, cît și la tineret. Aceeași diferență se observă și în cazul astaxantinei, pe cînd xantofilele au o participare egală la ambele sexe și vîrste.

La pereiopode (atît la pereiopodul I, cît și la pereiopodele II—V) și la resturile corporale, se observă în general că exemplarele tinere sînt mai bogate în pigmenți carotinoidici decît cele adulte.

Aceasta s-ar putea datora și schimbării raportului dintre epidermă și masa corporală care are loc în timpul creșterii. De asemenea se observă în toate cazurile un conținut mai mare de pigmenți la indivizii masculi decît la femele.

În ce privește raportul în care participă diferitele carotinoide, în pereiopodul I, β-carotina și 3-ceto-3′, 4′-hidroxi-β-carotina au aproximativ aceeași participare, indiferent de vîrstă și sex, pe cînd xantofilele au o participare mai mare la femele decît la indivizii masculi, și la tineret decît la adulți. În pereiopodele II—V, la exemplarele adulte toți pigmenții au aceeași participare în cazul ambelor sexe, diferențe (de altfel neesențiale) observîndu-se numai la tineret. La resturile corporale nu se sesizează diferențe nici între sexe, nici între vîrste. Se remarcă aici, mai pregnant decît la toate celelalte organe, predominanța astaxantinei.

Din cele constatate mai sus reiese existența unei corelații între felul carotinoidei și organ, precum și o diferențiere a carotinoidelor în funcție de sex și mai puțin de vîrstă.

Predominanța β-carotinei în hepatopancreas este evidentă. Ea rezultă și din alte lucrări [5], [1], [3] și se datorește, credem, unei preluări selective din hrană. Formarea astaxantinei, pigmentul principal în toate celelalte organe se presupune că are loc prin metabolizarea β-carotinei, avînd drept compuși intermediari hidroxi-ceto-hidroxi- și ceto-carotinoide. Prezența 4-ceto-3′, 4′-dehidro-β-carotinei semnalată de noi pentru prima dată în crustaceul *Xantho poressa* pledează pentru această cale de metabolizare, fie că se află ca atare în crustaceul viu, fie că provine prin deshidratare, în timpul păstrării și prelucrării, din 4-ceto-4′-hidroxi-β-carotină, pigment identificat de către Lee [6] în izopodul *Idothea granulosa*

Prezentat la redacție la 30 august 1971

Institutul agronomic „Dr. P. Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. E. Nicoară, C. Bilaus, C. Bodea, I. Petrescu, St. cerc. biochim., **13**, 65 (1970).
2. C. Bilaus, E. Nicoară, C. Bodea, I. Petrescu, St. cerc. biochim., **13**, 15 (1970).
3. C. Bilaus, E. Nicoară, C. Bodea, I. Petrescu, St. cerc. biochim., **14**, 123 (1971).
4. B. M. Gilchrist, Comp. Biochem. Physiol., **24**, 123 (1968).
5. B. M. Gilchrist, W. L. Lee, J. Zool., Lond., **151**, 171 (1967).
6. W. L. Lee, Comp. biochem. Physiol., **19**, 13 (1966).

THE CAROTENOIDS OF THE DECAPOD CRUSTACEAN *XANTHO PORESSA*

SUMMARY

The carotenoid pigments of the decapod crustacean *Xantho poressa* have been studied, according to organs, sex aud age (grawing and adult individuals).

Astaxanthin and β-carotene were the principal pigments and xanthophills and 4-keto-3′, 4′-dehydro-β-carotene the minor ones.

A correlation was found between the different organs and the carotenoids content as well as a differentiation due to sex and age.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 9–19 (1972)

RIBONUCLEAZELE DIN FORMAȚIUNILE SEMINȚELOR ȘI ORGANELE PLANTULELOR DE MAZĂRE *(PISUM SATIVUM)*

LILICA BOTOȘENEANU și S. VASU

Rezumat. — S-au urmărit activitatea RN-azelor și speciile moleculare cu activitate RN-azică, obținute prin electroforeză în gel de poliacrilamidă din formațiunile semințelor și din organele plantulelor de mazăre în vîrstă de 5-6 zile. Între formațiunile semințelor și organele plantulelor se constată diferențe privind pH-ul optim, activitatea RN-azică manifestată la diferite pH-uri, precum și numărul și mobilitatea electroforetică a Spciilor moleculare cu activitate RN-azică. În urma germinării semințelor pH-ul optim de 4,6 al RN-azelor din axul embrionar și cotiledoanele semințelor se schimbă în 5,2 la frunze, tulpini, rădăcini și cotiledoane. Totodată are loc o creștere marcantă a activității RN-azice precum și a vitezei de migrare electroforetică a fracțiunilor cu activitate RN-azică. Axul embrionar din semințele negerminate prezintă un spectru electroforetic al RN-azelor mult mai eterogen decît cotiledoanele, iar frunzele se diferențiază de celelalte organe ale plantulei de mazăre printr-o activitate RN-azică mai mare, în special la pH 7,2.

În germinarea semințelor de mazăre, variațiile cantitative ale acizilor nucleici [1], [2], precum și modificările unor specii moleculare de acizi ribonucleici (ARN) evidențiate electroforetic [3], [4], conduc la ideea că ribonucleazelor (RN-azelor) din formațiunile semințelor și organele plantulelor de mazăre le revine un rol important în acest proces.

Holden și Pirie [5] și Barker și Hollinshead [6] au purificat parțial și au caracterizat unele RN-aze din frunzele și cotiledoanele de mazăre. Barker și Douglas [1] au arătat că în cursul germinării semințelor de mazăre se produc modificări ale activității RN-azelor din cotiledoane și restul plantulelor, iar Barker și Hollinshead [7], urmărind degradarea ARN, în extracte de mazăre germinată, în prezența unor coloranți, indică existența a cel puțin două enzime de degradare, care sînt produse în stadii diferite ale germinării semințelor și creșterii plantelor. Prezența a două RN-aze, diferite prin pH-ul optim și localizarea lor intracelulară, este indicată de Lyndon [8] în rădăcinile de mazăre, iar Matsushita și Ibuki [9], studiind microzomii din plantulele de mazăre, arată deosebirile dintre RN-azele din particulele ribonucleoproteice și reticulul endoplasmatic. În felul acesta a apărut evidentă existența mai multor tipuri de RN-aze specifice unor organe [7] și chiar unor formațiuni subcelulare [8], [9] din mazăre. De fapt, existența mai multor tipuri de RN-aze a fost dovedită și în cazul altor plante superioare, ca de exemplu porumbul [10], [11], [12], grîul [13], bobul (14) etc.

Complexitatea aspectelor care ar rezulta din existența mai multor tipuri de RN-aze în formațiunile semințelor și organele plantulelor de mazăre, în strînsă legătură cu preocupările noastre privind metabolizarea diferitelor specii moleculare de ARN în procesul germinării semințelor de mazăre [3], [4], ne-a determinat să urmărim și să comparăm, pe de o parte activitatea RN-azelor din axul embrionar și cotiledoanele semințelor, iar pe de altă parte din frunzele, tulpinile, rădăcinile și cotiledoanele plantulelor. Rezultatele pe care le prezentăm, arată că, în urma germinării semințelor se produc modificări atît în pH-ul optim și în activitatea acestor enzime, cît și la nivelul diferitelor fracțiuni proteice cu activitate RN-azică, separate pe cale electroforetică după o metodă stabilită anterior [15], [16], pentru evidențierea RN-azelor din culturile de *Aspergillus niger*.

MATERIAL ȘI METODE

S-au folosit semințele hibridului de mazăre E 53/54 (ICCPT-Fundulea). Separarea formațiunilor semințelor negerminate, germinarea semințelor și separarea diferitelor organe ale plantulelor în vîrstă de 5—6 zile s-au efectuat în condițiile menționate în lucrări anterioare [3], [4].

RN-azele au fost extrase după Lyndon [8], cu zaharoză 0,5 M, Tris-HCl 0,03 M, pH 7,3, $MgCl_2$ 5 M și KCl 0,15 M, din axul embrionar și cotiledoanele semințelor negerminate, precum și din frunzele, tulpinile, rădăcinile și cotiledoanele plantulelor în vîrstă de 5—6 zile. S-au utilizat 5 ml extractant pentru 1 g făină provenită din formațiunile semințelor negerminate, iar pentru 1 g material proaspăt, provenit din organele plantulelor, s-a folosit 1 ml extractant pentru cotiledoane și cîte 2 ml pentru frunze, tulpini și rădăcini. Omogenatele obținute prin mojararea la rece, s-au filtrat după 60 min prin tifon, s-au centrifugat 15—20 min la 800 g, iar supernatantele s-au păstrat la —14°C.

Activitatea RN-azică s-a determinat în următoarele condiții : 0,2 ml supernatant (diluat 0,8/10—2,8/10 ml, în funcție de activitatea RN-azică manifestată), 0,2 ml tampon (acid citric 0,1 M-fosfat disodic 0,2 M, pH 4,2—8,0 și Tris 0,1 M-acid clorhidric, pH 7,2—9,0), 0,3 ml apă, se mențineau 15 min la 37°C ; se adăuga apoi 0,3 ml ARN (Serva) 0,1% (dializat la rece față de apă distilată). După 60 min la 37°C, se adăugau 0,25 ml acetat de uranil, 0,75% în acid percloric 25%. În condiții similare s-au efectuat probele martor, cu deosebirea că soluția de ARN se adăuga după acetatul de uranil în acid percloric. Probele astfel obținute se țineau 30 min în apă cu gheață, se centrifugau și supernatantul se dilua (la 0,2 ml s-au adăugat 9,8 ml apă cînd s-a lucrat pe plantule și 4,8 ml cînd s-a lucrat pe semințe negerminate) în vederea stabilirii $DO_{260\,nm}$. Se calcula diferența între $DO_{260\,nm}$ a probelor propriu-zise și probele martor, iar activitatea RN-azică se exprima în unități enzimatice convenționale. Unitatea RN-azică corespunde cantității de enzimă care, în condițiile menționate, eliberează produși acidosolubili care dau $DO_{260\,nm} = 1$ De la caz la caz, activitatea RN-azică s-a raportat la mg proteină sau la g țesut uscat.

Proteinele au fost determinate cu metoda Lowry, modificată de Miller [17].

Greutatea uscată s-a determinat prin uscarea materialului vegetal la 105°C.

Electroforeza extractelor proteice s-a realizat în plăci de gel de poliacrilamidă (6%), obținute după indicațiile date într-o lucrare anterioară [18], în tampon Tris 0,2 M acid citric pH 7,9, la circa 8—10 V/cm și circa 1—1,2 mA/cm, timp de 5—6 ore După electroforeză, pentru stabilirea fracțiunilor cu activitate RN-azică [15], [16], gelul s-a imersat (30 min) în ARN 0,5% (în tampon acid citric 0.1 M-fosfat disodic 0,2 M, pH 5,2, sau în tampon Tris 0,2 M acid clorhidric, pH 7,2), iar după scoaterea din soluția de ARN, gelul a fost incubat în cameră umedă, la 37°C, timp de 2—4 ore. Gelul se introducea apoi în etanol 25% — acid acetic 5%, timp de 2 ore, și se colora timp de 10 min cu albastru de toluidină 0,3% în acid acetic 1%. După spălarea gelului, de două ori cu acid acetic 2% și de repetate ori cu apă, fracțiunile cu activitate RN-azică se evidențiază sub forma unor pete incolore sau slab colorate, pe un fond intens colorat în albastru purpuriu.

REZULTATE

Prezentăm în figura 1 activitatea RN-azelor din axul embrionar și din cotiledoanele semințelor negerminate, în figura 2 din organele plantulelor în funcție de pH-ul mediului de reacție (activitatea RN-azică s-a exprimat în unități/ml extract enzimatic), iar în tabela 1 pH-urile optime.

Tabela 1

pH-ul optim al RN-azelor din formațiunile semințelor negerminate și din organele plantulelor de mazăre

Formațiuni și organe	pH-ul optim			
Ax embrionar (semințe negerminate)	4,6	6,2	7,2	8
Cotiledoane (semințe negerminate)	4,6	5,9—6,2	7,6	
Frunze	5,2	5,9	7,6	
Tulpini	5,2		7,4	
Rădăcini	5,2	6,4	7,2	8
Cotiledoane (plantule)	5,2		7,2	

După cum reiese din figura 1, la semințele negerminate activitatea RN-azelor din axul embrionar este în general mai mare decît aceea din cotiledoane. La plantule se remarcă, din figura 2, că activitatea RN-azelor din frunze prezintă valori mai mari decît în celelalte organe. Reise totodată, din ambele figuri, că în zona de pH slab alcalin activitatea RN-azelor în prezența tamponului Tris-HCl, indică în general, valori mai mari decît în prezența tamponului acid citric-fosfat disodic; acest decalaj e mai accentuat în special pentru RN-azele din frunze și din tulpini.

Tabela 1 scoate în evidență faptul că în domeniul de pH slab alcalin toate formațiunile semințelor și toate organele plantulelor de mazăre pre-

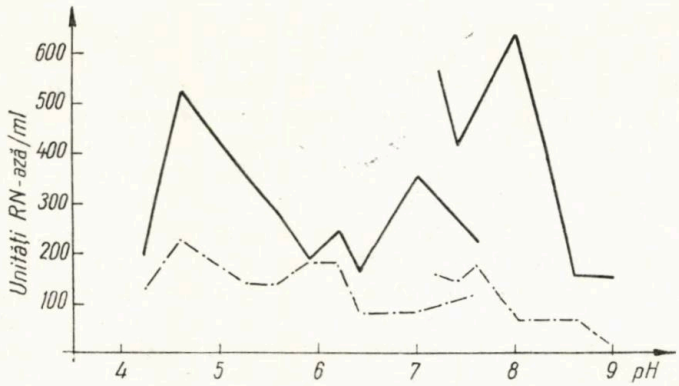


Fig. 1. — Activitatea RN-azelor din formațiunile semințelor de mazăre, în funcție de pH-ul mediului de reacție (unități RN-azice/ml).

pH 4,2 – 7,6 tampon acid citric-fosfat disodic; pH 6,2 – 9,0 tampon Tris – HCl.
——— ax embrionar; – · – · – · – cotiledoane.

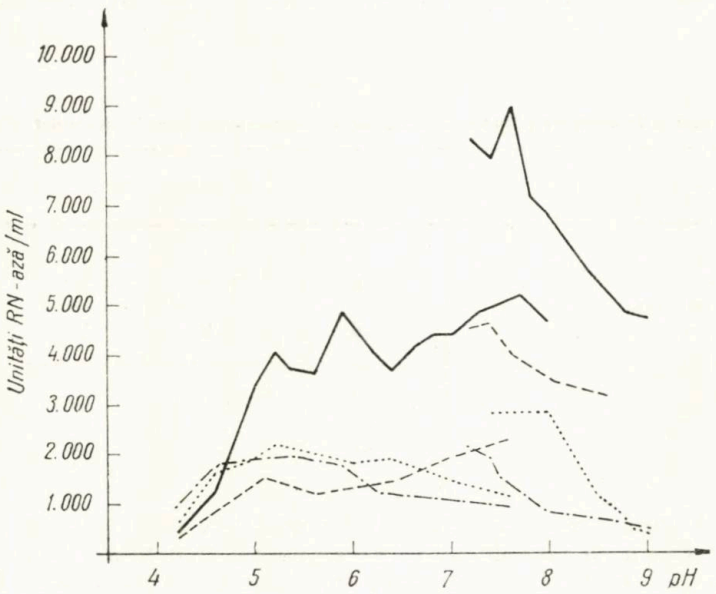


Fig. 2. — Activitatea RN-azelor din organele plantulelor de mazăre, în funcție de pH-ul mediului de reacție (unități RN-azice/ml).

pH 4,2 – 7,6 tampon acid citric-fosfat disodic; pH 7,2 – 9,0 tampon Tris-HCl.
——— frunze; – – – tulpini; – · – · – rădăcini; . . . . cotiledoane.

zintă un pH optim între 7,2—7,9 şi că în cazul axului embrionar şi al rădăcinilor găsim, în plus, un pH optim la pH-ul 8,0.

Diferenţa între formaţiunile seminţelor negerminate şi organele plantulelor apare, din acest punct de vedere, în domeniul acid, unde pH-ul optim de 4,6 al RN-azelor din ambele formaţiuni ale seminţelor negerminate se schimbă în 5,2 pentru toate organele plantulelor de mazăre. pH-ul optim 5,9—6,2 existent la RN-azele din formaţiunile seminţelor negerminate se regăseşte, după 5—6 zile de la germinare, numai la RN-azele din frunze şi rădăcini.

În tabela 2 este dată, în funcţie de pH-ul optim, activitatea RN-azelor din formaţiunile seminţelor şi din organele plantulelor de mazăre, raportată la mg proteină, respectiv la g material uscat. Rezultă din această

Tabela 2

Activitatea RN-azelor din formaţiunile seminţelor şi organelor plantulei de mazăre

Formaţiuni şi organe	pH—ul optim	RN—aza/mg proteină	RN—aza/g mat. uscat
Ax embrionar (seminţe negerminate)	4,6	11,2	2618,1
	6,2	5,4	1253,3
	7,2	12,3	2868,7
	8,0	13,7	3202,9
Cotiledoane (seminţe negerminate)	4,6	6,1	1141,9
	5,9	4,9	919,1
	7,6	4,7	891,3
Frunze	5,2	213,6	9486,4
	5,9	258,3	11476,2
	7,6	480,0	21425,3
Tulpini	5,2	163,0	3287,0
	7,4	500,7	10098,3
Rădăcini	5,2	319,4	4775,1
	6,4	273,2	4083,1
	7,2	317,1	4740,5
	8,0	270,8	4048,5
Cotiledoane	5,2	26,7	2965,3
	7,2	28,9	3213,4

tabelă o diferenţă marcantă între valorile mari obţinute pentru activitatea RN-azelor din organele plantulelor, în comparaţie cu cele obţinute pentru formaţiunile seminţelor negerminate. Diferenţele sînt mai evidente atunci cînd activitatea RN-azelor este raportată la mg proteină. În acest caz, RN-azele din cotiledoanele plantulelor prezintă şi ele valori mult mai mici decît cele din frunze, tulpini, şi rădăcini, care se plasează cam între aceleaşi limite. Aceste diferenţe sînt explicabile dacă luăm în considerare faptul că extractul enzimatic obţinut din formaţiunile seminţelor negerminate, ca şi din cotiledoanele plantulelor, conţine o cantitate de proteină de apro-

ximativ 3—4 ori mai mare decît extractele din frunze, din tulpini şi din rădăcini.

Dacă activitatea se raportează la g material uscat, atunci RN-azele din frunze au activitate cu mult mai mare decît cele din tulpini, din rădăcini şi din cotiledoane, care nu diferă prea mult între ele.

Luînd în considerare activitatea RN-azelor la diferite pH-uri optime, observăm că în cazul frunzelor şi tulpinilor RN-azele de pH slab alcalin sînt în general de 2—3 ori mai active decît cele de pH acid. Aceste organe se diferenţiază din acest punct de vedere de celelalte organe ale plantulelor, ca şi de formaţiunile seminţelor negerminate în care activitatea RN-azică, la pH alcalin, este practic egală sau foarte asemănătoare cu aceea de la pH acid.

Figura 3 cuprinde schematic activitatea RN-azelor din formaţiunile seminţelor şi din organele plantulelor de mazăre, evidenţiate în urma electroforezei extractelor enzimatice în gel de poliacrilamidă. Pentru stabilirea activităţii enzimatice, care se efectuează în urma electroforezei, din totalitatea pH-urilor optime menţionate am selectat pentru zona acidă pH-ul 5,2, iar pentru acea slab alcalină pH-ul 7,2.

La formaţiunile seminţelor negerminate, cea mai mare eterogenitate o găsim la axul embrionar, la care se identifică 8—9 fracţiuni cu activitate RN-azică, spre deosebire de cotiledoane unde se evidenţiază doar 5 fracţiuni. La cotiledoane, prima şi a treia fracţiune după start manifestă la ambele pH-uri o activitate mult mai intensă decît celelalte fracţiuni identificate atît la cotiledoane, cît şi în axul embrionar. Comparînd, în cazul axului embrionar, fracţiunile cu activitate RN-azică identificate la cele două pH-uri, constatăm că, cu excepţia fracţiunilor 1 şi 6 (pH 5,2), respectiv 1 şi 7 (pH 7,2) care migrează identic în gelul de poliacrilamidă, celelalte fracţiuni prezintă pe electroforegrame viteze de migrare diferite. La cotiledoane, în schimb, se observă patru fracţiuni cu viteză de migrare identică, la cele două pH-uri, şi anume fracţiunile 1, 2, 3, 5 (pH 5,2) şi 1, 2, 3, 4 (pH 7,2); diferenţa apare între fracţiunile 4 (pH 5,2) şi 5 (pH 7,2).

Referindu-ne la organele plantulelor de mazăre, din figura 3 se vede că în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă, de la start spre anod se evidenţiază 4 fracţiuni cu activitate RN-azică la frunze, 3—4 la tulpini, 3 la rădăcini şi 4—5 la cotiledoane, iar spre catod cîte o fracţiune, numai în cazul frunzelor şi cotiledoanelor.

Activitatea RN-azică a fracţiunilor din frunze şi cotiledoane este mai intensă la pH 7,2 decît la pH 5,2, spre deosebire de aceea din tulpini şi rădăcini, care practic nu se modifică prea mult.

În general, la organele plantulelor, majoritatea fracţiunilor identificate atît la pH 5,2 cît şi la pH 7,2 prezintă viteze de migrare destul de asemănătoare. Deosebirile rezidă în lipsa fracţiunilor cu viteză de migrare mică în cazul rădăcinilor, la ambele pH-uri, al tulpinilor la pH acid şi al cotiledoanelor la pH alcalin, precum şi în obţinerea în plus a unei fracţiuni cu activitate RN-azică la cotiledoane, respectiv fracţiunea 3 la pH 5,2 şi fracţiunea 2 la pH 7,2.

Comparînd spectrul electroforetic al RN-azelor din formaţiunile seminţelor şi din organele plantulelor de mazăre, rezultă că axul embrionar conţine cele mai multe fracţiuni cu activitate RN-azică, practic dublu

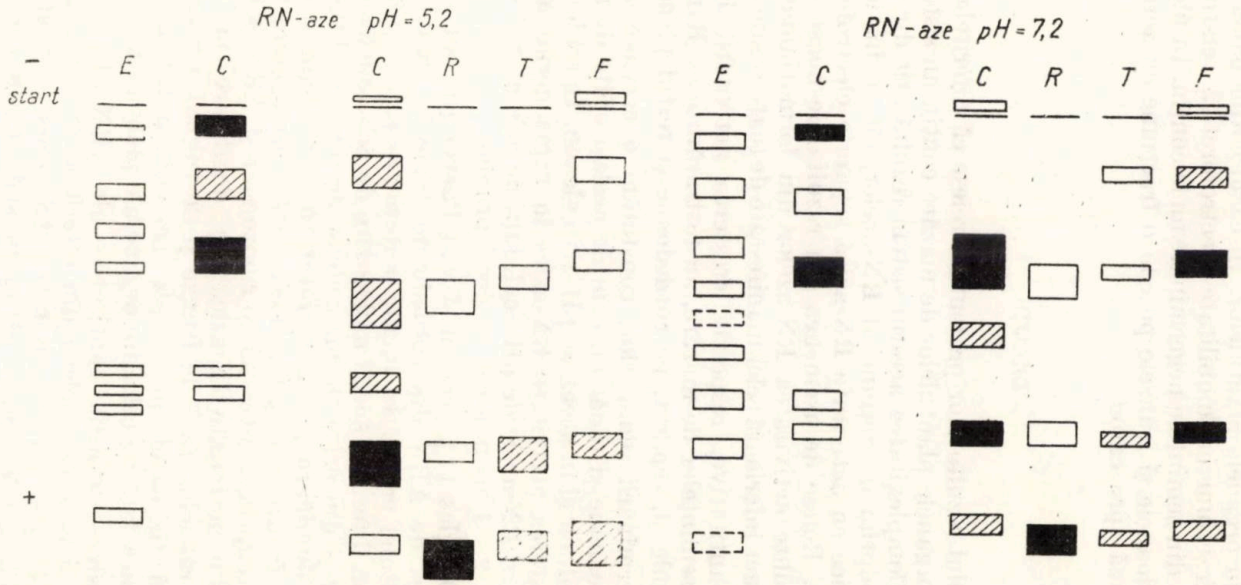


Fig. 3. — RN-azele din formațiunile semințelor și organelor plantulei de mazăre, evidențiate în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă.

Gel poliacrilamidă 6%; activitatea RN-azelor la pH 5 2 și 7 2; *E* = ax embrionar; *C* — cotiledoane; *R* — rădăcini; *T* — tulpini; *F* — frunze.

decît celelalte formaţiuni şi organe. Ambele formaţiuni ale seminţelor negerminate posedă forme moleculare cu viteză mică de migrare, pe care nu le mai găsim în organele plantulelor. În cazul cotiledoanelor, în urma germinării apar fracţiuni cu mobilitate electroforetică relativ mare, pe care cotiledoanele din seminţele negerminate nu le conţin. În plus, în urma. germinării, cotiledoanele şi frunzele posedă o fracţiune cu activitate RN-azică care migrează spre catod.

DISCUŢII

Din ansamblul rezultatelor prezentate reiese că diferitele formaţiuni ale seminţelor şi organele plantulelor de mazăre conţin un sistem RN-azic relativ complex. Complexitatea acestui sistem rezultă atît din datele referitoare la pH-ul optim de acţiune al RN-azelor, cît şi din identificarea fracţiunilor proteice cu activitate RN-azică separate electroforetic în gel de poliacrilamidă. Reiese de asemenea din rezultatele noastre că la pH-urile optime stabilite activitatea RN-azelor din formaţiunile seminţelor negerminate este net inferioară celei manifestate de toate organele plantulei.

Variaţiile cantitative, respectiv creşterea activităţii RN-azice în urma germinării seminţelor de mazăre, au fost arătate de Barker şi Douglas [1] pe plantule şi, separat, pe cotiledoane şi restul plantulelor.

În urma germinării seminţelor, constatăm o creştere a activităţii RN-azice în cotiledoane şi rădăcini, cam de acelaşi ordin de mărime atît în zona de pH acid, cît şi în aceea de pH slab alcalin. În schimb, în frunze şi în tulpini, creşterea activităţii RN-azice în urma germinării se realizează diferit pentru RN-azele de pH acid, faţă de cele de pH slab alcalin, care sînt de circa 2—3 ori mai active decît primele.

Barker şi Douglas [1], precum şi van Paryes [2], au arătat că, în general, cantitatea de ARN din cotiledoane scade în cursul germinării, iar în restul plantulei creşte. În lucrări anterioare [3], [4], urmărind pe cale electroforetică diferitele specii moleculare de acizi nucleici din formaţiunile seminţelor şi din organele plantulelor de mazăre obţinute în anumite condiţii de iluminare [4], am arătat că la rădăcini şi cotiledoane, spre deosebire de frunze şi tulpini, se constată o eterogenitate mai mare, mai ales în zona cuprinsă între ARN ribozomali şi ARN solubil. Acest fapt presupunea o activitate RN-azică de degradare mai intensă în cotiledoane şi în rădăcini, faţă de frunze şi de tulpini. Cu toate acestea, după cum rezultă din datele prezentate, activitatea RN-azică în cotiledoane este mai mică faţă de celelalte organe ale plantulelor.

Avînd în vedere variaţiile cantitative ale ARN [1], [2], eterogenitatea moleculară a acizilor nucleici din diferitele organe ale plantulelor de mazăre [3], [4], precum şi activitatea RN-azelor la diferitele pH-uri optime, ar fi posibil ca RN-azele cu pH optim slab alcalin, care se dovedesc a fi mai active, în special în frunze şi în tulpini, să fie implicate în metabolismul normal de creştere (de exemplu în metabolizarea ARN ribozomal sau a altor specii moleculare de ARN), iar RN-azele cu pH optim acid, să acţioneze mai ales în degradarea propriu-zisă a ARN. O interrelaţie similară între ARN şi RN-aze s-ar părea să aibă loc, după cum am arătat

într-o altă lucrare [16], în cazul creşterii şi dezvoltării miceliului de *Aspergillus niger*.

De altfel, Kessler şi Engelberg [19] au arătat, pe frunze de măr, că există o relaţie directă între conţinutul în ARN şi activitatea RN-azelor cu pH-ul optim cel mai ridicat (pH 6,5 al RN-azelor microzomale), şi una indirectă faţă de RN-azele de pH mai acid (pH 5,4 al RN-azelor din fracţiunea solubilă).

În urma germinării seminţelor de mazăre nu are loc numai o intensificare a activităţii diferitelor RN-aze, ci totodată par să se producă modificări ale înseşi moleculelor proteice care manifestă activitate RN-azică, sau să se sintetizeze noi RN-aze.

Astfel, pH-ul optim 4,6 al RN-azelor din ambele formaţiuni ale seminţelor se schimbă în 5,2 pentru RN-azele de pH acid, în toate organele plantulelor de mazăre. În cazul RN-azelor din embrionul de grîu, Vold şi Sypherd [13] găsesc un pH optim 5,0, care după 40 de ore de la germinarea seminţelor se schimbă în 5,5. Această schimbare de pH optim, după autorii menţionaţi, indică prezenţa unei RN-aze diferite faţă de aceea găsită iniţial în embrionul de grîu negerminat. Un fenomen similar a fost arătat şi în cazul altor enzime, ca de exemplu, pentru fosfataza acidă din porumb [20].

Activitatea RN-azelor din formaţiunile seminţelor şi din organele plantulelor, la diferite pH-uri optime, nu diferă prea mult dacă se foloseşte tamponul acid citric-fosfat disodic (pH de la 4—8); în schimb folosirea tamponului Tris-HCl, în zona de pH slab alcalină, duce la creşterea activităţii RN-azice de circa 2—3 ori, în cazul frunzelor şi tulpinilor, dar practic nu afectează activitatea RN-azelor din celelalte formaţiuni şi organe analizate. La grîu, Matsushita [21] constată că Tris-ul are un efect stimulator asupra activităţii unor RN-aze din frunze şi din rădăcini.

De altfel, modificări ale moleculelor proteice cu activitate RN-azică sau sinteza unor noi RN-aze reiese şi din evidenţierea activităţii RN-azice după electroforeza în gel de poliacrilamidă.

Astfel s-a văzut că în urma germinării seminţelor de mazăre se schimbă mobilitatea electroforetică a unor fracţiuni proteice sau apar fracţiuni noi, care manifestă activitate RN-azică. Eterogenitatea relativ mare a spectrului electroforetic al RN-azelor din axul embrionar, din care în urma germinării seminţelor se diferenţiază şi cresc rădăcinile, tulpinile şi frunzele plantulelor, nu se regăseşte dacă se alătură fracţiunile cu activitate RN-azică din organele menţionate, iar dacă comparăm fracţiunile proteice RN-azice din cotiledoanele seminţelor negerminate şi din plantule, constatăm de asemenea modificări ale mobilităţii electroforetice sau apariţia de noi specii moleculare RN-azice.

Este de aşteptat ca în cursul creşterii plantulelor de mazăre, în diferitele organe să se producă şi alte schimbări în spectrul electroforetic al RN-azelor.

Recent Sahulka [14], investigînd electroferetic RN-azele din rădăcini şi din frunze de *Vicia faba* L, a arătat identitatea electroforetică obţinută pentru trei zone diferite de creştere ale rădăcinilor şi producerea unei noi RN-aze în frunzele senescente, faţă de cele tinere.

Între electroforegramele RN-azelor din rădăcinile şi din frunzele de *Vicia faba* L [14], ca şi în cazul celor din organele plantulelor de ma-

zăre, analizate de noi, se constată atît asemănări cît şi deosebiri; există unele fracţiuni proteice cu activitate RN-azică comune diferitelor organe, alături de altele care par să fie diferite. Intensitatea activităţii manifestate de RN-aze diferă de la un organ la altul.

Nu putem face precizări în legătură cu rolul pe care ar putea să-l aibă speciile moleculare cu activitate RN-azică, separate electroforetic; ne preocupă în prezent acest aspect şi, totodată, distribuţia lor intracelulară, în strînsă legătură cu metabolizarea diferitelor specii moleculare de ARN.

CONCLUZII

1. Între formaţiunile seminţelor şi organele plantulelor se constată diferenţe privind pH-ul optim, activitatea RN-azică manifestată la diferite pH-uri, precum şi numărul şi mobilitatea electroforetică a speciilor moleculare cu activitate RN-azică.

2. În urma germinării seminţelor, pH-ul optim de 4,6 al RN-azelor din axul embrionar şi din cotiledoanele seminţelor se schimbă în 5,2 la frunze, tulpini, rădăcini şi cotiledoane. Totodată are loc o creştere marcantă a activităţii RN-azice, precum şi a vitezei de migrare electroforetică a fracţiunilor cu activitate RN-azică.

3. Axul embrionar din seminţele negerminate prezintă un spectru electroforetic al RN-azelor mult mai eterogen decît cotiledoanele.

4. Între organele plantulelor există asemănări şi deosebiri privind pH-ul optim, activitatea manifestată la diferitele pH-uri şi spectrul electroforetic al RN-azelor.

Prezentat la redacţie la 11 octombrie 1971

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. G. Barker, Th. Douglas, Nature, **188**, 943 (1960).
2. R. van Parjs, Arch. Intern. Physiol. Biochm., **75**, 125 (1965).
3. L. Botoşeneanu, S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **6**, 263 (1969).
4. L. Botoşvneanu, S. Vasu, St. cerc. biochim., **14**, 5 (1971).
5. M. Holden, N. Pirie, Biochem. J., **60**, 39 (1955).
6. G. Barker, J. Hollinshead, Biochem. J., **103**, 230 (1967).
7. G. Barker, J. Hollinshead, Nature, **212**, 926 (1966).
8. R. Lyndon, Biochem. Biophys. Acta, **113**, 110 (1966).
19. S. Matsushita, F. Ibuki, Biochim. Biophys. Acta, **40**, 358 (1960).
10. C. Wilsno, Biochim. Biophys. Acta, **76**, 324 (1963).
11. C. Wilson, Plant Physiol., **43**, 1332 (1968).
12. C. Wilson, Plant Physiol., **43**, 1339 (1968).
13. B. Vold, P. Sypherd, Plant Physiol., **43**, 1221 (1968).
14. J. Sahulka, Biol. Plantarum, **13**, 243 (1971).
15. S. Rădulescu, S. Vasu, Microbiologia (Lucrările conferinţei naţionale de microbiologie generală şi aplicată, Bucureşti, 4—7 dec. 1968) 1, 282 (1970).
16. S. Vasu, Şt. Hulea, S. Rădulescu, Rev. roum. Biochim., **8**, (1971).
17. G. Miller, Anal. Chim., **31**, 964 (1959).
18. S. Vasu, St. cerc. biochim., **12**, 393 (1969).
19. B. Kessler, N. Engelberg, Biochim. Biophys. Acta, **55**, 70 (1962).

20. V. Alexandrescu, D. Popov, St. cerc. biochim. **12**, 121 (1969).
21. S. Matsushita, Meeting of the Kansai branch of the Agricultural Chemical Society of Japan, Kyoto, 14 June, 1958.

RIBONUCLEASES IN THE SEED FORMATIONS AND THE ORGANS OF PEA SEEDLINGS (*PISUM SATIVUM*)

SUMMARY

The RN-ases activity and molecular species with RN-ase activity obtained by polyacrylamide gel electrophoresis from the seed formations and organs of pea seedlings after 5-6 days of germination, were followed.

Differences concerning the optimal pH, the RN-ase activity at various pH's, as well as the number and the electrophoretic mobility of molecular species with RN-ase activity, were found between seed formations and seedling organs. By seed germination the optimal pH 4,6 of RN-ases in the embrionic axis and cotyledons of the seeds changes into 5,2 in the leaves, stems, roots and cotyledons. A considerable enhancement of the RN-ase activity and of the electrophoretic mobility of the fractions with RN-ase activity, occurs as well. Embryonic axis in the ungerminated seeds has an electrophoretic pattern much more heterogeneous than the cotyledons, and the leaves are different from the other organs of the pea seedlings by a greater RN-ase activity, especially at pH 7.2.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 21–24 (1972)

ELIBERAREA AMINOACIZILOR DIN BIOSTRUCTURA FRUNZELOR DE GRÎU SUB ACȚIUNEA AZIDEI DE SODIU

IRINA CORNOIU

Rezumat. — S-a urmărit eliberarea aminoacizilor din biostructura frunzelor plantulelor de grîu sub acțiunea azidei de sodiu. S-a constatat că pe măsură ce concentrația soluției de azidă de sodiu crește, se obține un volum din ce în ce mai mare de suc, mai bogat în aminoacizi.

Inhibitorii metabolici, administrați în doze nemortale, ca dinitrofenolul, azida de sodiu și alții, produc în materialul biologic viu destrămarea parțială a biostructurii, cu eliberarea apei și a altor componente. Aceasta se datorește faptului că înhibitorii metabolici scad producerea de energie metabolică necesară existenței biostructurii [1]. Teoria biostructurii prevede că în prezența inhibitorilor metabolici se destramă în primul rînd acele straturi ale biostructurii ale căror componente sînt mai slab legate între ele. Pentru menținerea lor în biostructură este necesară o cantitate mică de energie și, deci, desprinderea lor poate fi provocată de o cantitate mică de inhibitori. În al doilea rînd se destramă acele straturi ale biostructurii, ale căror componente sînt mai puternic legate între ele, ale căror componente necesită o cantitate mare de energie și a căror desprindere poate fi provocată numai de o cantitate mai mare de inhibitori [2] [3].

Într-o lucrare anterioară [4] s-a arătat că biostructura conține și aminoacizi pe care-i eliberează în momentul destrămării ei. Destrămarea biostructurii s-a făcut prin două procedee : primul, prin înghețarea materialului vegetal proaspăt la temperatura de —10°C, iar al doilea, prin înghețarea materialului vegetal proaspăt cu ajutorul zăpezii carbonice. Pentru a vedea dacă o astfel de eliberare de aminoacizi are loc și în cazul unei destrămări parțiale, cum este aceea pe care o pot provoca inhibitori metabolici am introdus în plantule de grîu soluții de azidă de sodiu, în concentrații progresive, și am urmărit cantitățile de suc ce pot fi stoarse din plantulele astfel tratate precum și conținutul de aminoacizi al diferitelor sucuri obținute.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe plantule de grîu în vîrstă de două săptămîni, crescute în condiții de lumină artificială. Plantulele se tăiau de la colet, se legau în mănunchiuri de 100g și se introduceau în soluții apoase de azidă de sodiu

de concentrațiile : 0,005g% ; 0,05g% ; 0,5g%. După 24 de ore plantulele se scoteau, se spălau cu apă distilată, se uscau prin tamponare cu hîrtie de filtru și se storceau în presa hidraulică de laborator tip Hafico, la presiunea de 150 atm. Plantulele martor se prelucrau la fel, cu deosebirea că se introduceau în apă distilată. Sucul obținut se măsura, se centrifuga la 6000 rot/min și apoi se trecea pe o coloană încărcată cu Zerolit 225 (3 RC 10), 4—5% DVC, 52—100 mesch, pentru adsorbția aminoacizilor. Eluția aminoacizilor reținuți de rășină s-a făcut cu 30ml dintr-o soluție de amoniac 5%. Soluția amoniacală colectată cantitativ a fost evaporată la sec într-o capsulă de porțelan, pe o baie de apă.

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. Reziduul din capsulă a fost reluat cu 10 ml izopropanol 10% și s-au aplicat probe de 0,02 ml pe hîrtie Whatman nr. 1. Lichidul de irigare a fost format din butanol : acid acetic : apă (11 : 11 : 3). S-a efectuat cromatografia descendentă, cu două irigări succesive. Evidențierea aminoacizilor s-a făcut prin pulverizare cu o soluție de ninhidrină 0,3% în alcool etilic, iar dezvoltarea culorii a avut loc la temperatura camerei, la întuneric. Pe fiecare coală de hîrtie cromatografică au fost aplicate probe de 0,01 ml soluții de aminoacizi martori (M/100).

După 24 de ore de la pulverizarea cu ninhidrină, spoturile individuale ale aminoacizilor, precum și martorii respectivi, s-au decupat, s-au introdus în eprubete și s-au tratat cu clorură de cadmiu, transformîndu-se într-un complex cu cadmiu. După 48 de ore probele s-au eluat cu 3 ml alcool metilic și s-au fotometrat după 10 min la 540 mm. Calculul cantitativ s-a făcut în funcție de extincțiile aminoacizilor martori decupați de pe aceeași cromatogramă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din examinarea datelor obținute (tabela 1) reiese că volumul de suc stors din frunzele plantulelor martor este egal cu volumul de suc stors din frunzele plantulelor tratate cu o concentrație mică de azidă de sodiu și mai mic față de volumul de suc stors din frunzele plantulelor tratate cu concentrații mari de azidă de sodiu. Conținutul procentual de aminoacizi în sucul frunzelor martor este mai mic decît în sucul frunzelor tratate cu concentrații progresive de azidă de sodiu. Creșterea conținutului de aminoacizi în sucul frunzelor plantulelor tratate cu azidă de sodiu se observă chiar la o concentrație mică a acestuia de numai 0,005 g%. Cantitatea totală de aminoacizi cuprinsă în sucurile plantulelor tratate cu azidă de sodiu crește o dată cu mărirea concentrației acesteia, depășind cu mult valorile care corespund sucului obținut din frunzele plantulelor martor.

CONCLUZII

— Azida de sodiu provoacă destrămarea biostructurii plantulelor de grîu, cu eliberare de aminoacizi.

Tabela 1

Conținutul de aminoacizi al sucului stors din 100 g de frunze de grîu tratate cu azidă de sodiu în concentrații diferite

Aminoacizi	Plantule martor tratate cu apă	Plantule tratate cu soluție de azidă de sodiu		
		0,005%	0,05%	0,5%
	Volumul sucului stors la 150 atm (ml)			
	35	35	48	58
	Conținutul de aminoacizi al sucului (mg/100 ml)			
Cisteină	10,5	15,0	22,0	29,0
Asparagină	76,6	94,0	214,0	374,0
Histidină	19,4	20,0	35,0	63,4
Acid aspartic	6,0	6,8	12,5	29,0
Glicocol	13,0	15,7	26,0	33,0
Serină	3,2	3,4	6,6	10,0
Acid glutamic	3,0	4,8	5,6	9,0
Treonină	7,4	8,5	14,6	22,4
Alanină	17,0	20,0	56,0	139,0
Tyrosină	4,3	5,0	25,0	35,0
Metionină	9,0	11,4	18,0	33,0
Fenilalanină	26,0	27,4	66,6	126,0
Leucină	7,4	10,0	17,0	33,0
	Cantitatea de aminoacizi din suc (mg)			
Cisteină	3,7	5,5	10,5	17,0
Asparagină	28,8	33,0	103,0	217,0
Histidină	6,8	7,0	16,8	36,8
Acid aspartic	2,0	2,4	6,0	17,0
Glicocol	4,5	5,5	12,6	19,0
Serină	1,1	1,2	3,2	5,8
Acid glutamic	1,1	1,7	2,7	5,4
Treonină	2,6	3,0	7,0	13,0
Alanină	6,0	7,0	26,8	81,0
Tyrosină	1,5	1,7	12,0	20,0
Metionină	3,2	4,0	9,0	19,0
Fenilalanină	9,2	9,6	32,0	73,6
Leucină	2,6	3,5	8,0	19,0

— Această destrămare este cu atît mai înaintată și cantitățile de aminoacizi sînt cu atît mai mari, cu cît concentrația soluției de azidă folosită este mai ridicată.

Prezentat la redacție la 25 august 1971

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi St. cerc. biochim., **12**, 105 (1969).
2. E. Macovschi St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969)
3. V. Elefterescu St. cerc. biochim., **13**, 261 (1970).
4. I. Cornoiu, St. cerc. biochim., **14**, 17 (1971).

Prezentat la redacție la 30 septembrie 1971

THE RELEASE OF AMINO ACIDS FROM THE BIOSTRUCTURE OF WHEAT LEAVES UNDER THE INFLUENCE OF SODIUM AZIDE

SUMMARY

The amino acids release from the biostructure of wheat seedlings, induced by sodium azide, was followed. One found that the higher is the concentration of sodium azide solution, the greater is the yield of the sap as well as its amino acid content.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1. 25–29 (1972)

O NOUĂ METODĂ DE DETERMINARE CANTITATIVĂ TITRIMETRICĂ A ALCALOIZILOR TOTALI DIN PLANTA *CHELIDONIUM MAJUS* L.

A. GHEORGHIU şi ELENA IONESCU-MATIU

Rezumat. — S-a stabilit o metodă de dozare a alcaloizilor totali din *Chelidonium majus* L., rapidă, sensibilă şi reproductibilă, în mediu anhidru de cloroform, cu o soluţie de acid percloric în dioxan, la cristal violet ca indicator. Tehnica stabilită a permis să se dozeze atît chelidonina ca atare, cît şi alcaloizii totali din diferitele părţi ale acestei plante, înlăturînd inconvenientele pe care le prezintă celelalte metode din literatură.

În literatura de specialitate sînt indicate numeroase procedee pentru dozarea alcaloizilor totali din planta *Chelidonium majus* L. Astfel au fost elaborate metode protometrice în mediu apos [9], [5], [3], metode redoxometrice-iodometrice [2], [8], metode complexometrice [6], [7], precum şi o metodă de dozare a alcaloizilor totali din plantă în mediu de acid acetic cu acid percloric, folosind ca indicator cristal violet [1].

Întrucît se ştie că aceste metode prezintă o serie de dezavantaje, şi ţinînd seama de importanţa şi avantajele metodelor de dozare a alcaloizilor în mediu neapos, ne-am propus să elaborăm un procedeu de dozare în mediu anhidru pentru titrarea alcaloizilor totali din planta *Chelidonium majus* L.

În acest scop am folosit pe de o parte caracterele prototropice, dielectrice şi de disoluţie ale unor solvenţi organici, iar pe de altă parte, caracterele fizico-chimice ale alcaloizilor din această plantă.

MATERIAL ŞI METODE

Ca material de cercetare am folosit planta *Chelidonium majus* L. recoltată din judeţele Bihor — Valea lui Mihai, Cluj — Dej şi Neamţ — Roman Gîdinţi.

Ca reactivi am întrebuinţat:

— soluţie de acid percloric 0,10 N în dioxan;
— soluţie de acid percloric 0,01 N în dioxan;
— soluţie de cristal violet 0,10% în cloroform.

Pentru stabilirea echivalentului în chelidonină s-au cîntărit probe de 0,0500 — 0,0600 g chelidonină, care s-au dizolvat în 20 ml cloroform şi s-au titrat cu soluţie de acid percloric 0,10 N în dioxan, în prezenţa

a 4 picături soluţie 0,10% cristal violet în cloroform ca indicator, de la violet la verde albăstrui.

Calculele s-au făcut după formula:

$$X = \frac{a}{n \cdot F},$$

în care X este echivalentul chelidoninei pure; a — cantitatea de chelidonină luată în lucru; n — numărul de mililitri soluţie acid percloric 0,10 N în dioxan, folosiţi la titrare; F — factorul soluţiei de acid percloric 0,10 N în dioxan.

Pentru stabilirea erorilor de titrare a metodei elaborate de noi, am procedat astfel:

S-au cîntărit la balanţa analitică probe cuprinse între 0,0550 şi 0,0600 g chelidonină. Proba s-a adus cantitativ într-un flacon de titrare uscat şi s-a dizolvat în 20 ml cloroform. S-au adăugat 2 picături indicator soluţie cristal-violet şi s-a titrat cu soluţie de acid percloric 0,10 N în dioxan, pînă la virajul indicatorului, de la violet la verde-albăstrui; măsurarea volumelor de soluţie titrată s-a făcut cu o microbiuretă.

Acest procedeu l-am aplicat şi la titrarea alcaloizilor totali din planta *Chelidonium majus* L., după cum urmează:

10 g produs vegetal fin pulverizat *, alcalinizat şi uscat, s-a extras cu cloroform în aparat Soxhlet timp de 6 ore. Soluţia cloroformică s-a concentrat la volum mic (circa 50 ml) şi s-a adus într-o capsulă de porţelan în care s-a adăugat un amestec de acid sulfuric concentrat — zinc pulbere-acid acetic 30% (6 :8 :60) şi s-a ţinut pe baia de apă la fierbere timp de o oră, pînă cînd soluţia coloidală, brun-roşcată la început, a devenit slab gălbuie şi clară. Apoi s-a filtrat, reziduul s-a spălat de trei ori cu cîte 50 ml acid sulfuric 10%, pînă cînd apele de spălare nu au mai dat cu reactivul Mayer reacţia pozitivă pentru alcaloizi, s-a alcalinizat cu amoniac pînă la pH-ul 9 şi s-a extras de trei ori cu cîte 50 ml eter etilic. Soluţia eterică s-a filtrat, s-a concentrat la sicitate, iar reziduul s-a dizolvat în 50 ml cloroform. 25 ml din această soluţie cloroformică s-au titrat cu acid percloric 0,01 N în dioxan, în prezenţa indicatorului cristal-violet.

Această metodă a fost experimentată în comparaţie cu metoda titrării în mediu apos, oficializată şi în Farmacopeea Română [10], precum şi cu metoda titrării în care se foloseşte ca mediu de reacţie acidul acetic anhidru [8].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Echivalentul chelidoninei chimic pure a fost: $Eq = 0{,}0125$, adică 1 ml acid percloric 0,1 N corespunde la 0,0125 g chelidonină.

O parte din rezultatele obţinute pentru stabilirea erorilor de titrare a metodei elaborate de noi sînt înregistrate în tabela 1.

---

* Gradul de mărunţire sita nr. VII cu latura ochiului 0,17 mm.

Din tabelă rezultă că erorile de titrare a chelidoninei se încadrează în limita erorilor obținute la dozările volumetrice în mediu anhidru.

Rezultatele obținute prin aplicarea acestei metode la dozarea alcaloizilor totali din planta *Chelidonium majus* L. recoltată din bazinele natu-

Tabela 1

Stabilirea preciziei metodei

Nr. crt.	Chelidonina luată în lucru g	Cantitatea găsită		Eroarea față de medie
		g	%	
1	0,0588	0,0586	99,65	−0,17
2	0,0572	0,0571	99,80	−0,02
3	0,0590	0,0589	99,83	+0,01
4	0,0580	0,0579	99,82	0,00
5	0,0585	0,0585	100,00	+0,18
6	0,0590	0,0589	99,83	+0,01

$n = 6$; $M = 99,82$; $S = 0,11$; $S_m = 0,05$; $\alpha = 0,95$; $t_\alpha = 2,57$; $A = 99,82 \pm 0,13$.

n = numărul de determinări; M = media determinărilor; S = abaterea pătratică a mediei; Sm = dispersie; α = coeficientul de siguranță; t_α = parametrul de probabilitate A = valoarea reală.

rale din județele Bihor — Valea lui Mihai, Cluj — Dej și Neamț — Roman — Gîdinți, comparate cu rezultatele obținute cu metoda titrării în mediu apos, oficializată în „Farmacopeea română" [10], precum și cu cele obținute prin metoda de titrare în care se folosește ca mediu de reacție acidul acetic anhidru, sînt cuprinse în tabela 2.

Din tabela 2 rezultă următoarele: folosind cele trei metode la dozarea alcaloizilor din același produs vegetal, recoltat din același bazin natural, fie părțile aeriene, fie părțile subterane, cele mai ridicate valori s-au obținut cu metoda elaborată de noi, iar cele mai scăzute cu metoda indicată de „Farmacopeea română" [10].

Interpretînd aceste rezultate în acord cu considerații de ordin teoretic, se pot releva următoarele:

Cloroformul, solvent aprotic, constituie un mediu de dizolvare foarte bun pentru alcaloizii din planta *Chelidonium majus* L., asigurînd în același timp un viraj net pentru indicatorul întrebuințat. În acest solvent în care funcțiile acide și bazice practic nu există (solvent inert), bazicitatea alcaloizilor se manifestă pe o scară de pH foarte extinsă, ceea ce face posibilă titrarea ei cu soluție de acid percloric, de asemenea în solvent aprotic.

Metoda citată în literatura de specialitate [8], în care se folosește acidul acetic anhidru, prezintă unele inconveniente datorate acțiunii protogenice a solventului, care se poate manifesta și față de alte substanțe nealcaloidice, puterii de disoluție reduse, manifestată mai ales față de unii perclorați organici (perclorați de alcaloizi), ceea ce conduce la tulburarea soluției către punctul de echivalență, făcînd mai puțin precisă prinderea acestuia, pentru care fapt o putem considera mai puțin exactă. De altfel, literatura de specialitate din ultimul timp [4] este bogată în date care evi-

Tabela 2

Conţinutul în alcaloizi în părţile subterane şi aeriene ale plantei *Chelidonium majus* L., din trei bazine naturale, obţinut prin trei metode de dozare

Nr. crt.	Judeţul	Bazinul natural	Produsul vegetal	Determinarea cantitativă a alcaloizilor		
				Metoda în mediu apos F.R. VIII g%	Metoda în mediu anhidru (acid acetic) g%	Metoda * în mediu anhidru (cloroform) g%
1	Bihor	Oradea Valea lui Mihai	părţi aeriene	0,4174	0,4215	0,4786
			părţi subterane	0,7875	0,8719	1,0460
2	Cluj	Dej	părţi aeriene	0,3609	0,4293	0,4768
			părţi subterane	0,7348	0,7818	0,9268
3	Neamţ	Roman Gidinţi	părţi aeriene	0,3476	0,4531	0,4738
			părţi subterane	0,8492	0,8843	0,9462

* Elaborată de noi

denţiază avantajele solvenţilor aprotici, faţă de cei protogenici, în titrările în mediu neapos.

Metoda de dozare în mediu apos înscrisă în „Farmacopeea română" [10] prezintă numeroase dezavantaje legate de: puterea insuficientă de relevare a funcţiilor bazice ale alcaloizilor, efectul de dizolvare redus (apariţia unui precipitat galben abundent înainte de virajul indicatorului), precum şi greutăţile întîmpinate la prinderea exactă a punctului de echivalenţă.

CONCLUZII

Metoda de determinare cantitativă a alcaloizilor totali din *Chelidonium majus* L., propusă în prezenta lucrare, bazată pe titrarea unui extract cloroformic cu o soluţie de acid percloric în dioxan, în prezenţă de cristal-violet ca indicator, este simplă, rapidă, sensibilă şi dă rezultate reproductibile.

Această metodă prezintă numeroase avantaje atît faţă de metoda

de determinare în mediu apos, înscrisă în „Farmacopeea română", cît şi faţă de metoda de determinare în mediu de acid acetic anhidru.

Prezentat la redacţie la 30 septembrie 1971

Facultatea de farmacie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Domagalina Eugenia, Ochyńska Janina, Chem. Anal. Warsaw., **8,** 225 (1963); Chem Abstr., **59**, 14292 a (1963).
2. Gallis F., Bull. Sci. Pharmacol., 1935, **42,** 278 şi 408; Chem. Abstr., **29,** 6536[4] (1935).
3. Kajderowicz-Jarosinska- Danuta, Dissertationes Pharm., **13,** 357 (1961); Chem. Abstr. **36**, 8839 d (1962).
4. Kolthoff J. M., Elving P. J., *Treatise on Analytical Chemistry,* The Interscience Encyclopedia, New York, 1959, **1,** Part. I.
5. Negebauer E., Brunner K., Pharm. Zhalle, **78,** 18 (1937); Chem. Abstr. **31,** 2350[7] (1937).
6. Ochyńska Janina, Krówczyński L., Chem. Anal., **4,** 309 (1959); Chem. Abstr., **53,** 17427 i (1959).
7. Ochyńska Janina, Chem. Anal., **6,** 261 (1961); Chem. Abstr., **55,** 16911 (1961).
8. Porebski J., Jarosinska D., Diss. Pharm. Pharmacol., **18,** 625 (1966); Chem. Abstr., **67,** 25424 n (1967).
9. Schenk G., Graf H., Arch. Pharm., **275,** 113 (1937).
ed. a VIII-a, supliment, 1968.
10 * * * Farmacopeea română, ed. a VIII, supliment, 1968

A NEW METHOD OF TITRIMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL ALKALOIDS IN *CHELIDONIUM MAJOS* L. PLANT

SUMMARY

The authors have established a rapid, sensitive and reproducible method for assaying the amount of total alkaloids in *Chelidonium majus* L., in anhydrous medium of chloroform, with a solution of perchloric acid in dioxane, and using crystal violet as indicator.

The technique allowed to measure both the amount of chelidonine as such, and the alkaloids in various parts of the plant, avoiding the shortcomings of the other methods mentioned in the literature.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 31–41 (1972)

INFLUENȚA SĂRURILOR DE LITIU ASUPRA CINETICII PIROFOSFATAZEI CEREBRALE

E. HADARAG și L. M. BURUIANĂ

Rezumat. — Se cercetează efectul ionilor de litiu, *in vivo*, asupra cineticii pirofosfatazei din creier. Experiențele s-au făcut pe șobolani injectați în fiecare zi cu cîte 2 mg LiCl, timp de 30 de zile. La intervale de 5 zile s-au sacrificat animale injectate și neinjectate și s-a prelevat creierul. S-au determinat proteinele totale, activitatea pirofosfatazică, constanta Michaelis (K_m), constanta de inhibiție (K_i) și energia de activare (E). Ionii de litiu provoacă o puternică inhibiție a pirofosfatazei cerebrale. Cea mai mare inhibiție a fost observată după 20 de zile de la începutul experiențelor, apoi a scăzut. Constanta Michaelis a crescut, iar afinitatea enzimei pentru substrat a scăzut. Din calcularea lui K_i reiese că litiul manifestă o mare afinitate pentru pirofosfataza cerebrală. Energia de activare nu a variat semnificativ. Aceste rezultate demonstrează că ionii de litiu produc o modificare structurală a proteinei enzimatice, schimbînd intensitatea glicolizei. Faptul ar putea explica efectul terapeutic al sărurilor de litiu în afecțiunile nervoase.

Cercetările noastre efectuate anterior [8] cu privire la acțiunea, *in vitro*, a ionilor de litiu asupra pirofosfatazei din diferite lichide și țesuturi de origine animală au arătat că aceștia exercită o puternică inhibiție, mai ales, a enzimei din țesutul cerebral. Comportamentul litiului față de pirofosfataza din creier ne preocupă în mod deosebit, datorită atît importanței pe care această enzimă o are în metabolismul cerebral, cît și faptului că litiul a devenit un agent terapeutic interesant în combaterea afecțiunilor nervoase.

Sărurile de litiu au fost utilizate pentru prima dată în tratamentul unor psihoze în 1949, în urma observațiilor lui Cade [4] referitoare la influența litiului asupra organismelor vii. Rezultatele obținute au suscitat controverse, care, riguros controlate și discutate de Baastrup și Schou [2], au dus la concluzia că acest element este un factor specific în tratamentul stărilor de manii și hipomanii, ca și în profilaxia stărilor maniaco-depresive. Marea sa specificitate a sugerat ideea că sărurile de litiu pot constitui totodată un test farmacologic important pentru studiul fiziopatologiei afecțiunilor depresive.

În acest sens, Greenspan și colab. [7] cercetează retenția și distribuția litiului administrat sub formă de Li_2CO_3 la bolnavii maniaco-depresivi. Stanley și colab. [13] pun în evidență corelația dintre litiu și diferite aspecte specifice ale metabolismului în tulburări psihice. Autorii

afirmă, între altele, că clorura de litiu modifică concentraţia catecholaminelor din sînge şi din ţesutul cerebral, crescută în manii şi scăzută în depresiuni. Faptul poate furniza o explicaţie a eficacităţii litiului în aceste afecţiuni. Schou şi colab. [12] arată că tratamentul cu săruri de litiu afectează metabolismul iodului din glanda troidă, provocînd apariţia guşei. Alţi cercetători semnalează toxicitatea litiului în cazul cînd se acumulează în ţesuturi, ceea ce face încă discutabilă utilizarea lui în scop terapeutic.

Din cele cîteva exemple menţionate reiese că influenţa litiului asupra organismelor vii ridică probleme care preocupă pe mulţi specialişti din diferite domenii, întrucît atît efectul terapeutic, cît şi modul său de acţiune nu sînt pe deplin cunoscute.

Se presupune că litiul participă la procesele de transport activ, modificînd eficienţa pompei de sodiu prin acţiunea exercitată asupra ATP-azei din membrana celulară. Prin prezenţa sa el influenţează echilibrul ionic din celule şi activitatea unor enzime, provocînd astfel schimbarea tipului de metabolism.

Pe baza acestor considerente şi în scopul de a stabili o corelaţie între acţiunea terapeutică a litiului în diferite psihoze şi mecanismul prin care el influenţează metabolismul cerebral, am urmărit, mai întîi *in vitro* comportamentul său faţă de pirofosfataza cerebrală, ceea ce a făcut obiectul unor cercetări publicate [8].

În prezenta lucrare se urmăreşte efectul *in vivo* al sărurilor de litiu asupra cineticii pirofosfatazei din creier.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele s-au executat pe loturi de şobolani de aceeaşi greutate şi sex, hrăniţi identic, unul din loturi, netratat, servind ca martor. Şobolanii din loturile experimentale au fost injectaţi zilnic, intraperitoneal, cu cîte 2 mg LiCl, timp de 30 de zile. La interval de 5 zile s-au sacrificat animale din lotul martor şi din loturile experimentale. S-a prelevat creierul şi s-a omogenizat în tampon Tris, cu pH = 7,2, adăugat în proporţie de 1/10 greutate/volum. Omogenatul a fost ţinut 24 de ore la frigider, la +4°C. După acest timp s-a centrifugat iniţial la 5 000 rot/min şi după aceea la 10 000 rot/min, cîte 15 minute. Supernatantul, perfect limpede, a servit ca sursă de enzimă pentru cercetarea cineticii pirofosfatazei cerebrale. În acest scop s-au determinat : proteinele totale după tehnica lui Miller [11], activitatea pirofosfatazică cu ajutorul unei tehnici descrisă anterior [3], constanta Michaelis (K_m) prin metoda grafică Lineaweaver şi Burk [10], constanta de inhibiţie (K_i) după procedeul Dixon [5] mai întîi iar apoi servindu-ne de relaţia prezentată mai jos şi energia de activare (E) prin trasarea dreptelor Arrhenius [1].

REZULTATE

Efectul produs de litiu s-a remarcat începînd cu a 10-a zi de experienţă. Rezultatele obţinute au arătat că sub influenţa ionilor de litiu activitatea pirofosfatazei cerebrale scade. În figura 1 se vede că această scădere este maximă după 20 de zile de la administrare, respectiv după un aport de 40 mg LiCl.

Prin întreruperea administrării clorurii de litiu la unul din loturile experimentale, cu 5 zile înainte de sacrificare, s-a constatat o tendinţă de revenire la normal. Valorile activităţii pirofosfatazei cerebrale au fost în acest caz foarte asemănătoare cu cele obţinute la lotul martor. Efectul litiului asupra pirofosfatazei durează deci numai dacă administrarea este continuă. Inhibiţia provocată de ionii de litiu este de tip competitiv, aşa cum reiese din graficele Lineweaver & Burk.

Afinitatea enzimei pentru substrat scade de circa 3 ori faţă de lotul martor, constanta Michaelis devenind în consecinţă de 3 ori mai mare. În figura 3 prezentăm variaţia procentuală a afinităţii enzimei pentru substrat, în funcţie de cantitatea de LiCl administrată.

Metoda Dixon pentru calcularea constantei de inhibiţie (K_i) nu este aplicabilă întrucît, după cum se vede din figura 4, în loc de drepte se obţin curbe exponenţiale.

De aceea calcularea constantei de inhibiţie s-a făcut cu ajutorul relaţiei :

$$K_i = \frac{I}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$$

în care I este concentraţia în LiCl, K_p — constanta Michaelis în prezenţa clorurii de litiu iar K_m constanta Michaelis în absenţa clorurii de litiu.

Datele obţinute sînt consemnate în tabela 1.

Din tabelă se constată că afinitatea fitiului pentru pirofosfatază atinge valoarea maximă după 20 de zile de la administrarea clorurii de litiu. Faptul corespunde cu maximul acţiunii inhibitoare. Conform teoriilor actuale, între substrat şi efectori pot avec loc reacţii cooperative ce provoacă o modificare conformaţională a proteinei enzimatice. Pentru a pune în evidenţă asemenea schimbări se trasează curbele care reprezintă variaţia activităţii cu concentraţia substratului, înainte şi după acţiunea efectorilor.

Trasîndu-se aceste curbe la martori şi la animalele cărora li s-a administrat LiCl, s-au obţinut rezultatele prezentate în figura 5.

După cum se vede, în cazul animalelor netratate curba are un aspect hiperbolic, ceea ce denotă că avem de-a face cu o reacţie monomoleculară de ordinul I, care urmează legile simple ale lui Michaelis. La animalele tratate prin administrarea progresivă a clorurii de litiu curbele capătă un caracter sigmoidal, dovedind că se produce o schimbare a conformaţiei proteinei enzimatice; afinitatea faţă de substrat se modifică din cauza acţiunii alosterice a ionilor de litiu. Prin întreruperea administrării clorurii de litiu, aspectul curbei tinde din nou către hiperbola Michaelis.

Dreptele Arrhenius trasate pentru calcularea energiei de activare

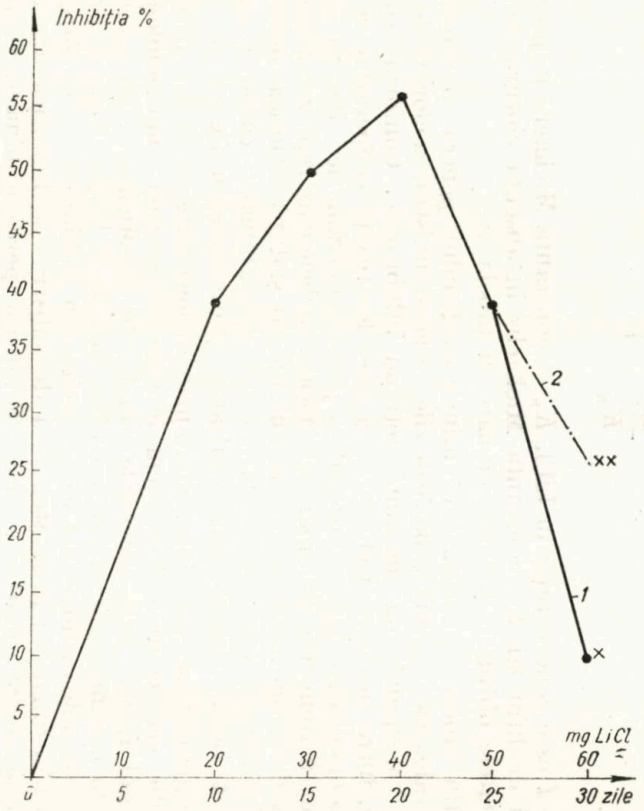


Fig. 1. — Variația procentuală a inhibiției activității pirofosfatazei cerebrale cu concentrația clorurii de litiu.

1 — injectat 30 de zile cu LiCl; *2* — injectat 25 de zile cu LiCl, repaus 5 zile

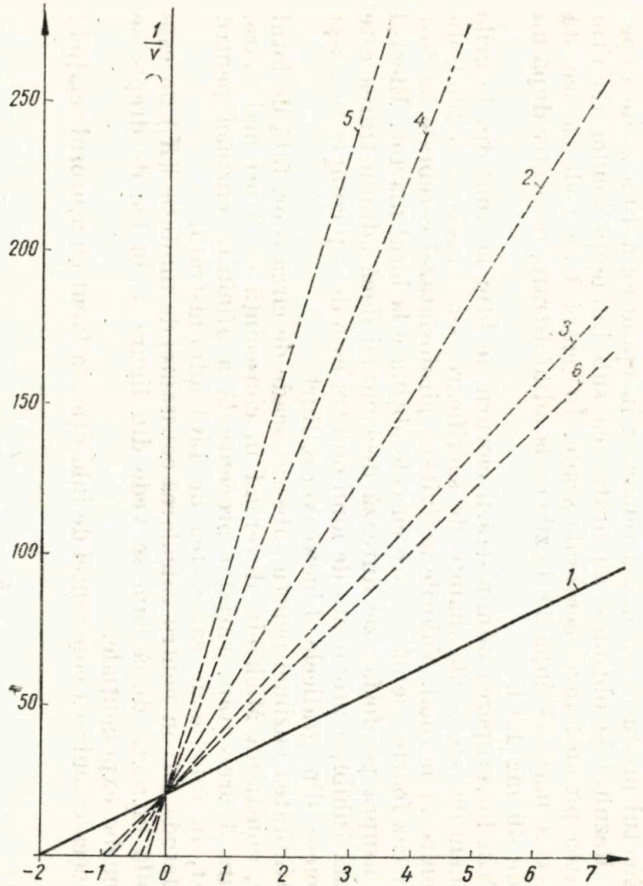


Fig. 2. — Inhibiția competitivă produsă de clorura de litiu asupra pirofosfatazei cerebrale.

1 — martor; *2* — cu 20 mg LiCl; *3* — cu 30 mg LiCl; *4* — cu 40 mg LiCl; *5* — cu 50 mg LiCl; *6* — cu 60 mg LiCl.

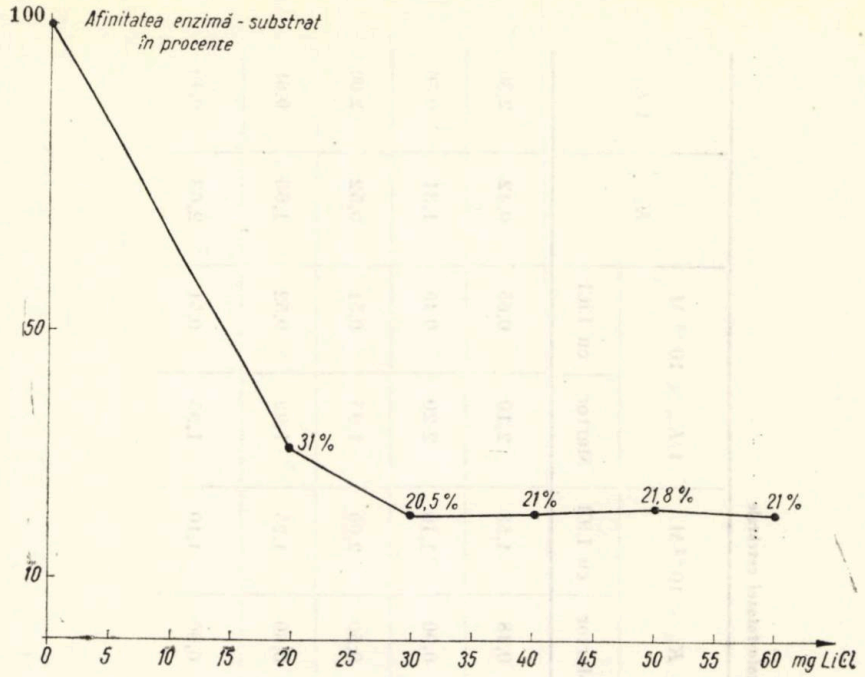


Fig. 3. — Variația procentuală a afinității enzimei pentru substrat cu concentrația clorurii de litiu administrată.

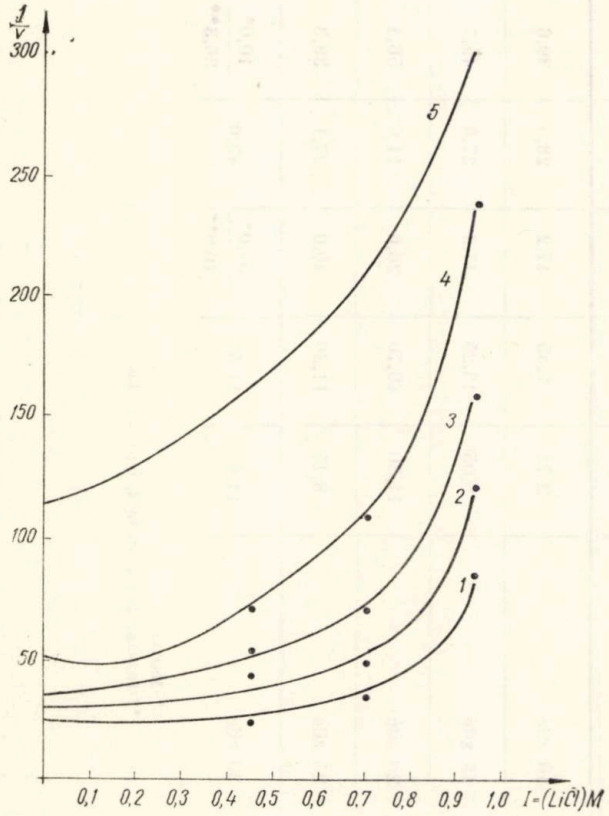


Fig. 4. — Variația inhibiției pirofosfatazei cerebrale cu concentrația clorurii de litiu, pentru diferite concentrații de substrat (reprezentare după Dixon).

1 — concentrația substratului $1{,}40 \times 10^{-3}$ M; *2* — $1{,}05 \times 10^{-3}$ M; *3* — $0{,}70 \times 10^{-3}$ M; *4* — $0{,}35 \times 10^{-3}$ M; *5* — $0{,}14 \times 10^{-3}$ M.

Tabela 1

Influența ionilor de litiu asupra cineticii pirofosfatazei cerebrale

Intervalul de timp între sacrificări	Proteine totale mg/ml		Activ. P-P-ază U.P-P/g prot.		Inhibiția %	$K_m \times 10^{-3}$ M		$1/K_m \times 10^{-3}$ M		K_i	$1/K_i$
	Martor	cu LiCl	Martor	cu LiCl		Martor	cu LiCl	Martor	cu LiCl		
10 zile	2,71	2,85	47,2	28,5	39,6	0,48	1,53	2,10	0,65	0,42	2,30
15 zile	9,05	13,25	47,3	27,8	49,7	0,90	1,10	2,20	0,45	1,31	0,76
20 zile	11,30	10,70	26,6	11,6	56,4	0,50	2,00	1,95	0,51	0,52	2,00
25 zile	8,45	11,30	40,0	27,1	39,3	0,80	1,25	1,92	0,52	1,65	0,61
30 zile	11,65	11,65	57,0* / 46,6**	42,0	10,0* / 26,3**	0,90	1,10	1,95	0,51	2,63	0,40

* Martor.

** Injectat 25 zile cu LiCl, repaus 5 zile.

au panta asemănătoare, fapt care arată că sub acţiunea ionilor de litiu acest parametru cinetic nu se schimbă. Pentru ilustrarea celor afirmate redăm în figurile 6 şi 7 dreptele Arrhenius obţinute după prima şi ultima perioadă de administrare a clorurii de litiu.

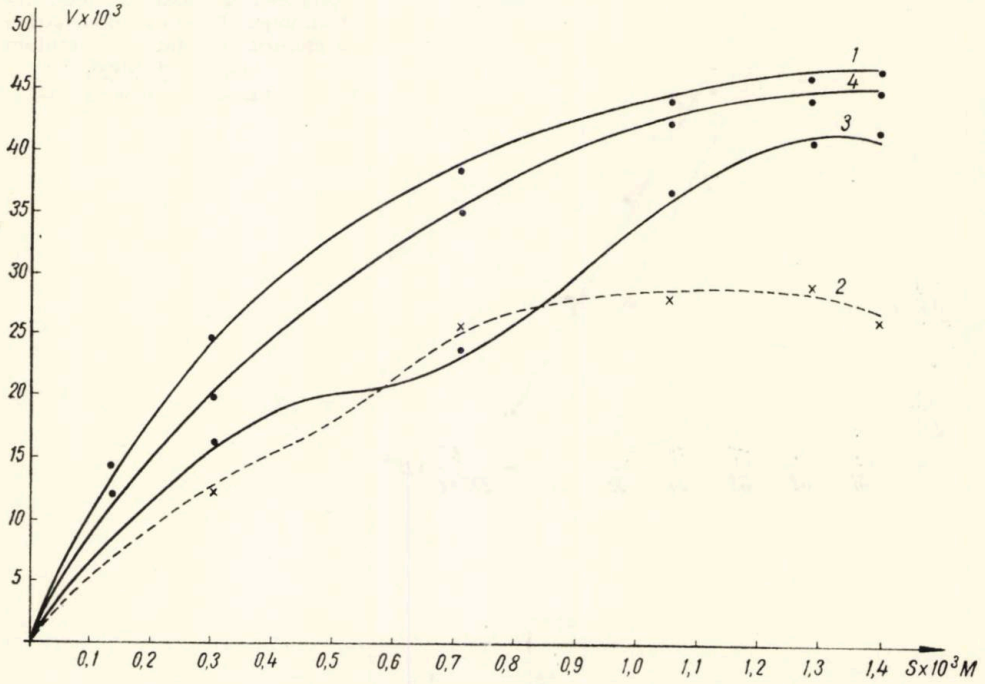


Fig. 5. — Variaţia activităţii pirofosfatazei cerebrale cu concentraţia în substrat.
1 — martor; *2* — cu 30 mg LiCl; *3* — cu 60 mg LiCl; *4* — injectat 25 zile, repaus 5 zile.

Din aceste grafice se vede că punctele de inflexiune la care are loc schimbarea energiei de activare apar la aceeaşi temperatură, atît în cazul animalelor martor cît şi în al celor care au primit clorură de litiu. Tabela 1 dă o imagine completă a efectului ionilor de litiu asupra cineticii pirofosfatazei. Rezultatele le confirmă în mare măsură pe cele obţinute anterior *in vitro*.

DISCUŢII

Acţiunea pirofosfatazei fiind strîns corelată cu structura stereospecifică a proteinei enzimatice, determinarea activităţii şi a parametrilor săi cinetici poate da informaţii cu privire la procesele metabolice care au loc în ţesutul cerebral.

Sensibilitatea enzimelor în general — şi a pirofosfatazei anorganice în special — se reflectă în modul de comportare faţă de condiţiile de mediu şi de influenţa unor efectori.

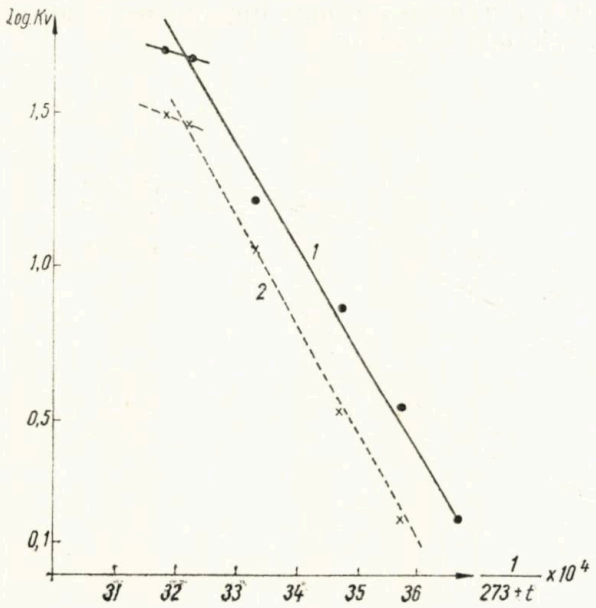


Fig. 6. — Variația activității pirofosfatazei cerebrale cu temperatura după 10 zile de administrare a clorurii de litiu (reprezentare după Arrhenius).

1 — martor; *2* — cu 20 mg LiCl

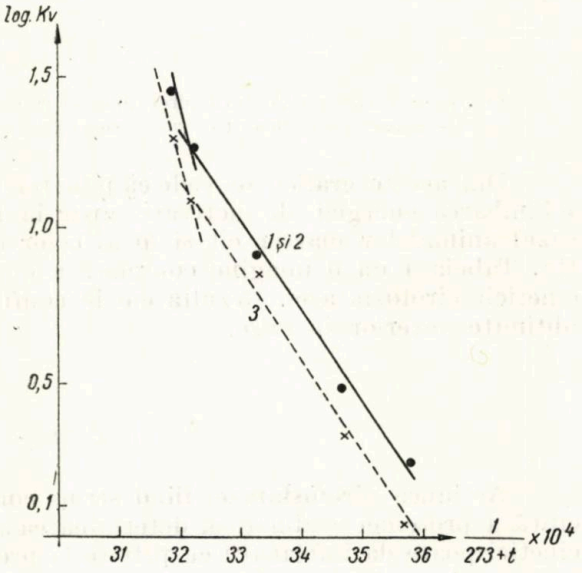


Fig. 7. — Variația activității pirofosfatazei cerebrale cu temperatura după 30 de zile de administrare a clorurii de litiu (reprezentare după Arrhenius).

1 — martor; 2 — injectat 25 zile cu LiCl, repaus 5 zile; *3* — cu 60 mg. LiCl.

Din rezultatele prezentate reiese că sub influenţa litiului activitatea pirofosfatazei scade, producîndu-se totodată o schimbare a cineticii ei. Această constatare prezintă o deosebită importanţă, întrucît se ştie că litiul face parte din elementele cu masa atomică sub 50, care de obicei sînt activatoare. Deşi atomul său are raza şi sarcina electrică reduse, totuşi el se combină cu uşurinţă cu enzima şi formează complexul pirofosfatază — Li^+, scăzînd astfel afinitatea enzimei pentru substrat. Prin complexarea cu enzima are loc o deformare a edificiului macromolecular specific al proteinei active şi apariţia unei structuri noi, cu un alt aranjament spaţial şi care, desigur, modifică legătura cu substratul.

De altfel, faptul că prin metoda Dixon se obţin curbe cu un aspect exponenţial, şi nu linii drepte, este un indiciu că sub influenţa litiului s-a produs o deformare a structurii proteice iniţiale, şi nu o competiţie pentru centrul de legătură cu substratul.

Modificarea cineticii pirofosfatazei şi scăderea activităţii ei totale provoacă o micşorare a energogenezei, prin blocarea fosfaţilor ca pirofosfaţi, şi, în consecinţă, o carenţă în grupări fosforil necesare numeroaselor procese metablice.

Această părere concordă cu observaţia lui Dousa şi Hechter [6], după care litiul este un inhibitor specific al enzimelor ce intervin în formarea adenozin-monofosfatului (AMP) ciclic din ţesutul cerebral. Întrucît experienţele efectuate pe bolnavii maniaco-depresivi au arătat că concentraţia AMP-lui ciclic din ţesuturile acestora se modifică — creşte în manii şi scade în depresiuni —, cei doi autori menţionaţi ajung la concluzia că efectul terapeutic al litiului în manie poate fi, cel puţin în parte, datorat inhibiţiei formării AMP-lui ciclic în diferite ţesuturi, în special în creier.

Sărurile de litiu, aşa cum au arătat Hertz şi Schou [9], stimulează iniţial respiraţia cortexului cerebral, prin activarea glicolizei aerobe şi inhibarea sintezei ATP-lui şi creatin-fosfatului. Ulterior acestui efect are loc o micşorare a consumului de oxigen.

Corelînd constatările diverşilor autori cu rezultatele noastre, se poate presupune că litiul provoacă o decuplare temporară a proceselor de fosforilare şi oxidare.

Mărirea cantităţii de pirofosfat prin inhibarea pirofosfatazei duce la o scădere a concentraţiei în ortofosfat şi ATP necesari glicolizei anaerobe, care este diminuată în favoarea glicolizei aerobe. Credem că prin aceste mecanisme litiul acţionează ca un cofactor al enzimelor reglatoare, readucînd la normal, în mare parte, principalele procese metabolice din creier, tulburate în cursul stărilor maniaco-depresive. Se poate presupune, deci, că efectul terapeutic al litiului în afecţiunile nervoase menţionate se datoreşte modificării metabolismului specific, prin acţiunea exercitată asupra unor enzime care intervin în dinamica fosfaţilor cerebrali.

CONCLUZII

1. Sub influenţa ionilor de litiu activitatea pirofosfatazei cerebrale scade. Inhibiţia devine maximă după 20 de zile de la administrarea clorurii de litiu, respectiv după un aport de 40 mg clorură de litiu.

2. Afinitatea enzimei pentru substrat scade de circa 2 ori faţă de lotul martor, constanta Michaelis fiind de 3 ori mai mare.

3. Litiul manifestă o afinitate mare pentru pirofosfataza cerebrală, aşa cum reiese din calcularea constantei de inhibiţie.

4. Energia de activare nu variază semnificativ, ceea ce denotă că ionii de litiu nu acţionează asupra centrilor activi ai pirofosfatazei.

5. Scăderea activităţii pirofosfatazei şi schimbarea cineticii ei sub acţiunea litiului se datoresc unei modificări a edificiului macromolecular al proteinei active.

6. Efectul terapeutic al litiului în tratamentul unor afecţiuni nervoase s-ar putea explica prin acţiunea exercitată de acesta asupra unor enzime care intervin în dinamica fosfaţilor cerebrali.

Laboratorul de biochimie,
Facultatea de medicină veterinară
Institutul agronomic
„N. Bălcescu", Bucureşti

Prezentat la redacţie la 15 septembrie 1971

BIBLIOGRAFIE

1. Arrhenius S., Z. Phys. Chem., **IV**, 226 (1889).
2. Baastrup P. C., Schou M., Arch. Gen. Psychiat., **16**, 162 (1967).
3. Buruiană L. M., Hadarag Elena, Lucr. ştiinţifice IANB, Bucureşti, seria C, vol. VIII, 157 (1965).
4. Cade J. F. J., Med. J., **2**, 349 (1949).
5. Dixon M., Webb E., *Enzymes*, Longmans, Londra, 1964.
6. Dousa Th., Hechter O., citat după *New Scientist*, vol. 46, nr. 698, 166 (1970).
7. Greenspan K., Goodwin F. K., Bunney W. E., Durell J., Arch. Gen. Psychiat., **19**, *6*, 664 (1968).
8. Hadarag Elena, St. cerc. biochim., **13**, *1*, 37 (1970).
9. Hertz L., Schou M., Biochem. J., **85**, 93 (1962).
10. Lineweaver H., Burk D., J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658 (1934).
11. Miller G. L., Anal. Chem., **31**, *5*, 964 (1959).
12. Schou M., Amdisen A., Jensen S. E., Olsen T., Brit. Med. J., **3**, 710 (1968).
13. Stanley R., Platman M. B., Ronald R., Fieve U. D., Arch. Gen. Psychiat., **19**, *6*, 659, (1968).

INFLUENCE OF LITHIUM SALTS ON THE KINETIC PYROPHOSPHATASE ACTIVITY OF BRAIN

SUMMARY

The effect of Li^+ ions, *in vivo*, on the kinetics of pyrophosphatase activity of brain has been investigated. The experiments were carried out on rats, daily injected with 2 mg LiCl for 30 days. After various doses the animals were killed and the brains collected. Total proteins, pyrophos-

phatase activity, Michaelis constant (K_m) inhibitor constant (K_i) and activation energy were determined.

Lithium ions produce a high inhibition on the brain pyrophosphatase activity. The greatest inhibition was noticed after 20 days from the beginning of the experiments (40 mg total LiCl injected); afterwards inhibition began to diminish. Michaelis constant increases and the enzyme affinity decreases. From the calculation of K_i it results that Li^+ ions manifest a great affinity for brain pyrophosphatase. The activation energy variation was not significant.

These results demonstrate that lithium ions produce structural modifications in the enzymatic protein, changing the intensity of glycolysis. This fact could explain the therapeutic effect of lithium salts in nervous affections.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1. 43–47 (1972)

IZOENZIMELE PEROXIDAZICE DIN MERE, ÎN TIMPUL CREȘTERII ȘI MATURĂRII LOR

ELENA ILIESCU și ZOIȚA MARCU

Rezumat. — S-au determinat electroforetic izoperoxidazele din pulpa și pieliţa merelor Jonathan și Starking, în timpul creșterii și maturării lor pe pom și în timpul păstrării. S-a stabilit că pieliţa este foarte bogată în izoperoxidaze catodice și anodice, iar pulpa săracă. La începutul maturării fructelor (punctul climacteric), la ambele soiuri dispare din pieliţă o aceeași fracţiune catodică, apărînd alta anodică, ambele cu mobilităţile cele mai mici. Se poate considera că această modificare marchează momentul optim pentru recoltare. Scăderea și chiar dispariţia unei fracţiuni catodice cu mobilitate mare marchează maturitatea deplină a fructelor (februarie).

Alături de activitatea oxidazică [1], am urmărit în merele Jonathan și Starking și evoluţia fracţiunilor izoperoxidazice, în timpul creșterii și maturării lor pe pom și în timpul păstrării, în anul 1969—1970.

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul studiat a fost același cu cel folosit în lucrarea anterioară [1].

Izoperoxidazele s-au determinat electroforetic, după metoda stabilită de unul dintre noi [2], în extracte în tampon veronal, cu pH 8,6 și μ 0,1, la un raport de extracţie de 1 : 1 (pulpă) și 1 : 2 (pieliţă), pe gel de agar 1,25%. Fracţiunile s-au detectat cu reactiv cu benzidină, în prezenţa H_2O_2 (1%). Proba medie s-a alcătuit din 12 fructe, luîndu-se cîte două secţiuni egale din fiecare fruct (din părţi opuse).

Pe electroforegramă, fracţiunile izoperoxidazice s-au notat arbitrar cu numerele 1—5, în ordinea crescătoare a mobilităţilor de la start spre catod (*c*) ale celor electropozitive, respectiv spre anod (*a*) ale celor electronegative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Figurile 1 și 2 arată că spectrele izoperoxidazice diferă foarte mult de la pulpă la pieliţa fructului, ultima fiind foarte bogată în fracţiuni, iar prima foarte săracă. Variaţii evidente, legate de etapele de creștere și de

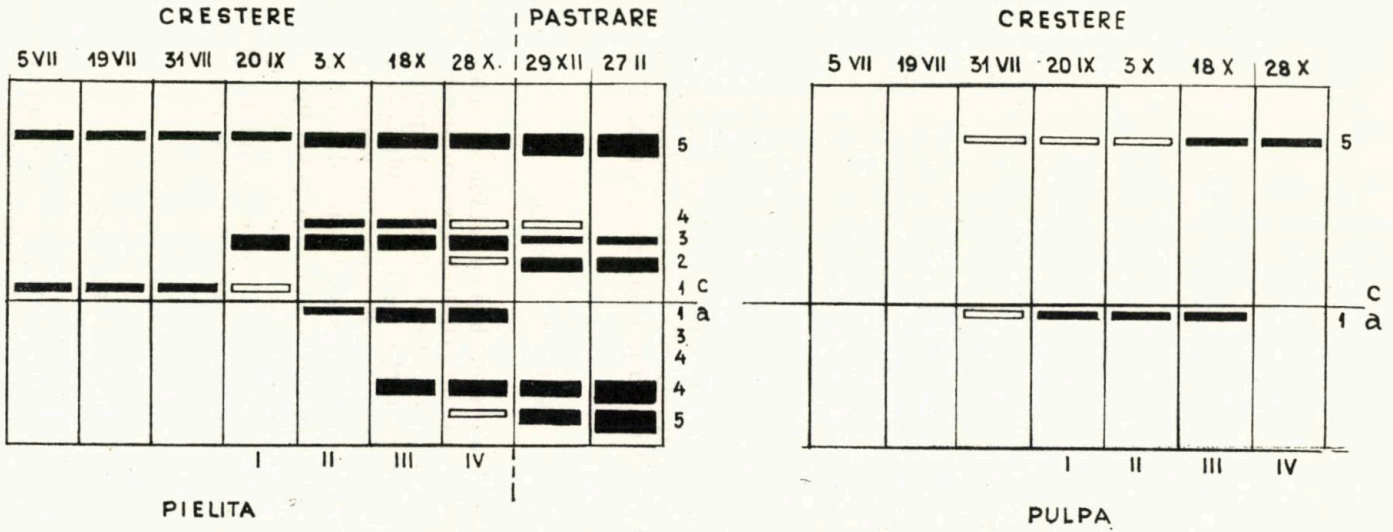


Fig. 1. — Fracțiunile proteice peroxidazice în merele Jonathan.

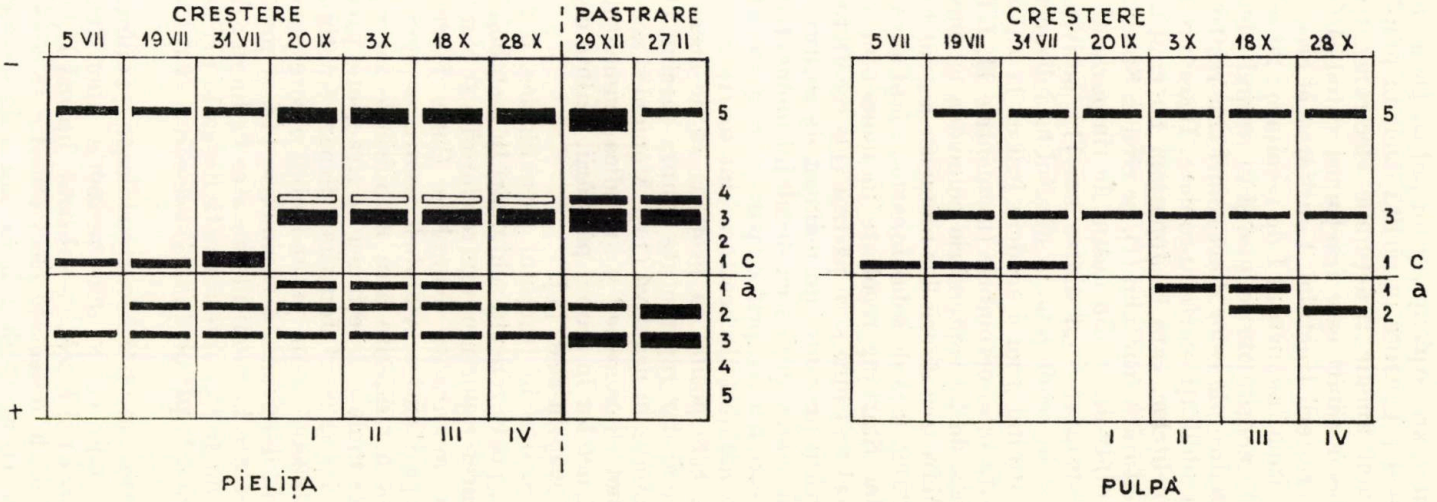


Fig. 2. — Fracțiunile proteice peroxidazice în merele Starking.

dezvoltare a fructului, arată pieliţa, şi nu pulpa. De asemenea, diferenţele dintre soiuri sînt mai pregnante în pieliţă decît în pulpă, şi cu deosebire evidente în domeniul anodic (fracţiunile electronegative).

Comună ambelor soiuri este fracţiunea catodică 5c, prezentă permanent în timpul creşterii fructului. Cantitatea ei creşte o dată cu începutul maturării acestuia (momentul I de recoltare : 20 sept. — Starking ; 3 oct. — Jonathan), menţinîndu-se apoi şi în timpul păstrării. Deosebirile dintre spectrele catodice ale celor două soiuri sînt relativ mici, fracţiunile 2c, 3c şi 4c avînd mobilităţi foarte apropiate. Deosebire mare arată spectrele anodice ale pieliţelor, care la Jonathan nu conţin nici o fracţiune pînă la începutul maturării fructului (I), pe cînd la Starking două fracţiuni sînt prezente încă dintr-un stadiu destul de timpuriu al creşterii.

Aşa cum a constatat unul dintre noi [1], activitatea peroxidazei, determinată iodometric, scade pînă la sfîrşitul lui iulie, creşte din nou pînă în septembrie (I), urmînd apoi o scădere bruscă la valori foarte mici, la care se menţine toată luna octombrie (momentele II, III şi IV). Am presupus atunci că data de 20 septembrie coincidea cu începutul maturării fructului pe pom. Marcarea diferitelor momente a avut totdeauna un uşor avans la soiul Starking, faţă de soiul Jonathan, fapt atestat şi de păstrarea mai bună a merelor Starking recoltate în momentul I, faţă de merele Jonathan, la care cel mai bine s-au păstrat cele recoltate în momentul II.

În cadrul lucrării prezente, un moment de cotitură, ce se manifestă identic la cele două soiuri, numai cu decalajul momentelor (I la Starking şi II la Jonathan), este marcat prin dispariţia fracţiunii 1c şi apariţia fracţiunii 1a. Deoarece mobilităţile acestora sînt foarte mici, ele fiind foarte apropiate de start, este posibil ca proteina să fie aceeaşi, suferind doar schimbări foarte mici, dar repercutate asupra sarcinii electrice care, din pozitivă (1c), se schimbă în negativă (1a). Momentul acesta ar corespunde aşa-numitului „punct climacteric" şi ar indica momentul cel mai potrivit pentru recoltarea fructelor în scopul păstrării, înainte de atingerea maturităţii de livadă propriu-zise [1].

Îmbogăţirea pieliţei în fracţiuni peroxidazice, o dată cu începutul maturării fructului, poate reflecta schimbări în metabolismul pigmenţilor, ştiută fiind schimbarea raportului dintre clorofilă şi pigmenţii antocianici.

La atingerea maturităţii complete (luna februarie), fracţiunile catodice sînt aproape identice la ambele soiuri, pe cînd cele anodice, tot egale la număr, sînt net diferite prin mobilităţile lor electroforetice. La soiul Starking scade mult şi fracţiunea 5c (fracţiune prezentă permanent în pieliţa merelor), iar la soiul Jonathan dispare fracţiunea 4c.

În lucrarea prezentă n-am putut stabili o corespondenţă între activitatea peroxidazică, determinată titrimetric [1], şi prezenţa fracţiunilor electroforetice, detectate în condiţiile noastre de lucru : determinată titrimetric, peroxidaza nu şi-a manifestat activitatea la pH uşor alcalin (7,14) decît sporadic, pe cînd la pH acid (4,94) aceasta a avut valori uneori chiar mari.

Pe de altă parte, activităţii foarte ridicate a polifenoloxidazei determinată titrimetric, nu-i corespunde prezenţa unor fracţiuni electroforetice (folosind diferiţi polifenoli, ca substrat, lipsind H_2O_2) decît în urme. S-ar putea ca proteinele detectate electroforetic să aibă (şi) alte funcţii în ţesutul viu, ceea ce ar explica lipsa sau valorile mici ale activităţii

peroxidazice determinate titrimetric, sau, practic, absența electroforetică a polifenoloxidazelor.

CONCLUZII

În timpul creșterii și maturării fructului de măr, metabolismul acestuia are momente demarcante, evidențiate la nivelul prezenței fracțiunilor peroxidazice, în special în pieliță, momente traduse prin dispariția, diminuarea sensibilă sau apariția unor fracțiuni catodice sau anodice.

Între soiuri nu sînt diferențe prea mari în privința spectrelor fracțiunilor catodice. Asemenea diferențe sînt însă marcante în spectrele fracțiunilor anodice.

Nu se poate stabili o corespondență între prezența electroforetică a anumitor fracțiuni izoperoxidazice și manifestarea activității acestei enzime, determinată titrimetric, probabil datorită diferențelor de pH.

Faptul că pulpa este foarte săracă în izoperoxidaze, comparativ cu pielița fructului, arată că procesele oxido-reducătoare prin intermediul peroxizilor sînt mult mai intense în aceasta din urmă, sau că aceste proteine mai pot avea și alte funcții în țesutul viu.

Prezentat la redacție la 29 aprilie 1971

Institutul de cercetări pentru pomicultură, Stațiunea experimentală pomicolă Voinești, Județul Dîmbovița

BIBLIOGRAFIE

1. Elena Iliescu, St. cerc. biochim., **14**, 4, (1971).
2. I. Brad, N. Hurduc, St. Niculescu, Z. Marcu, St. cerc. biochim., **11**, 2, 111 (1968).

THE ISOPEROXIDASES OF APPLES DURING GROWTH AND MATURATION

SUMMARY

The isoperoxidases of pulp and skin of Ionathan and Starking apples have been studied electrophoretically, during their growth and maturation on the tree and during the storage.

It has been established that the skin is very rich in cathodic and anodic isoperoxidases, while the pulp is poor.

At the beginning of apple's maturation (the climacterical point) in the skin of both varieties the same cathodic fraction disappears, with appearance of an anodic one, both of them with the least mobilities. This modification may be considered as marking the moment of harvest.

The diminution or even the disappearance of a cathodic fraction of great mobility marks the entire maturity of the apples (February).

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 49–54 (1972)

EVALUAREA LICHIDELOR EXTRACELULARE PRIN DETERMINAREA CONCOMITENTĂ A SPAȚIULUI DE TIOCIANAT ȘI GLUCOZĂ. STUDIU COMPARATIV ÎNTRE NORMAL ȘI DIABETIC

NATALIA MIHALACHE

Rezumat. — Valorile găsite la normali prin determinarea spațiului de glucoză și, respectiv, a spațiului de tiocianat sînt cuprinse în jurul cifrei de 20±3% din greutatea corporală. La diabetici am găsit o diferență netă între aceste două exprimări ale volumului lichidelor extracelulare, spațiul de glucoză avînd valori mai mari decît cel de tiocianat. Se consideră că această diferență se datorește faptului că în tulburările de metabolism glucidic, glucoza este neuniform repartizată între diversele sectoare ale lichidelor extracelulare, fiind mai concentrată în cel interstițial.

Celulele organismului sînt puse în contact cu mediul exterior prin intermediul lichidelor extracelulare, alcătuite din lichide circulante (sînge, limfă), lichide necirculante (interstițiale, cerebrospinal, ocular etc.), sucurile secretate de diverse glande (salivar, intestinal etc.) și urină [1], [2], [3], [4].

Pentru măsurarea spațiului extracelular au fost propuse diferite metode, fără ca vreuna dintre ele să fie absolut riguroasă.

În lucrarea de față ne-am propus să studiem lichidele extracelulare, la normal și diabetic, folosind în paralel evaluarea acestora prin spațiul de tiocianat și prin cel de glucoză. Am considerat aceste substanțe drept cele mai indicate în acest scop pentru următoarele considerente teoretice: greutatea moleculară a tiocianatului, comparată cu cea a glucozei, face să se întrevadă că difuziunea acestor substanțe prin peretele capilar este de același ordin de mărime, iar din punctul de vedere al comportamentului lor renal, ambele sînt activ reabsorbite la nivelul tubilor contorți.

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul comparativ al lichidelor extracelulare prin injectare concomitentă de glucoză 50 g% și tiocianat 10g% s-a făcut pe un număr de 45 normali și 200 diabetici, folosind următoarea metodă:

Bolnavului, în repaus la pat de cel puțin 8 ore, după evacuarea vezicii i se recoltează 1 ml sînge pe FNa, pentru determinarea glicemiei și 7 ml sînge pe oxalat de sodiu, martorul dozărilor de tiocianat. Prin același ac se introduc apoi:

— glucoză 50 g%, în cantitate de 0,33 g glucoză/kg corp, injectată în maximum 2 minute, pentru ca toată această cantitate de glucoză să fie supusă în același timp difuziunii în lichidele extracelulare și metabolizării. Se notează precis momentul sfîrșitului injectării;

— tiocianat de sodiu 10 g%, în cantitate de 10 ml, în timp de 1 minut.

În brațul opus se introduce un ac de mandrin tip pneumotorace, prin care se introduc 1—2 ml heparină, pentru evitarea coagulării sîngelui. Acest ac rămîne în venă pe tot timpul probei. Prin acest ac se recoltează cîte 1 ml sînge, pe FNa, la următoarele intervale de timp: 5; 10; 15; 20 și 30 min. Prin același ac se recoltează cîte 7—8 ml sînge pe oxalat de sodiu, pentru determinarea tiocianatului, la următoarele intervale de timp: 1; 2 și 4 ore. Pentru motive de confort al bolnavului, ultimele probe pentru tiocianat se pot recolta și prin puncție venoasă separată. Concomitent, în primele 4—5 ore de la începutul probei se recoltează urina, pentru cercetarea glicozuriei, care de obicei lipsește. Prezența glucozei în urină reprezintă o pierdere renală de care trebuie ținut seama la interpretarea probei.

Determinarea glicemiei se face cu metoda Hagedorn-Jensen [5], iar tiocianatul este determinat după metoda Cachera și Lamotte [6], folosind, fotometrul Pulfrich cu dispozitiv Elpho II sau spectrofotometrul Spekol.

Pentru trasarea curbei etalon se folosește o soluție de NaSCN care conține 0,1 mg tiocianat/ml.

Glicistia s-a putut doza pe lichidul interstițial extras din veziculele formate pe piele prin criocauterizare. S-a folosit metoda Hagedorn-Jensen [5].

CALCULAREA SPAȚIULUI DE TIOCIANAT ȘI GLUCOZĂ

Dinamica tiocianatemiei, ca și a glicemiei după injectare intravenoasă, respectă o evoluție semilogaritmică, așa cum se vede din figurile 1 și 2.

Extrapolînd dreapta semilogaritmică trasată, pînă la t_0 se obține ordonata la origine. Antilogaritmul acestei valori reprezintă concentrația teoretică limită exprimată în mg/100 ml, pe care am notat-o cu $SCN^-_{(t_0 + \varepsilon)}$, respectiv $G_{\varepsilon \to 0}(t_0 + \varepsilon)$ și care reprezintă concentrația care ar fi fost atinsă imediat după injectare, dacă injecția s-ar fi făcut brusc și dacă difuziunea substanței ar fi avut loc în mod instantaneu în toate lichidele extracelulare.

Formula de calcul pentru spațiul de tiocianat este următoarea:

$$\text{Sp } SCN^- = \frac{SCN^- \text{ (grame)}}{SCN^-_{\varepsilon \to 0}(t_0 + \varepsilon)} \text{ litri,}$$

ceea ce reprezintă raportul dintre cantitatea de tiocianat injectată și tiocianatemia limită $SCN^-_{\varepsilon \to 0}(t_0 + \varepsilon)$.

Ţinînd cont de greutatea corporală a bolnavului, printr-un calcul de proporţii se obţine volumul lichidelor extracelulare, exprimat în procente.

În cazul spaţiului de glucoză, formula de calcul este următoarea :

$$\text{Sp Gl} = \frac{\text{Gl (grame)}}{G(t_o + \varepsilon) - G_o} \text{ litri,}$$

$\varepsilon \to 0$

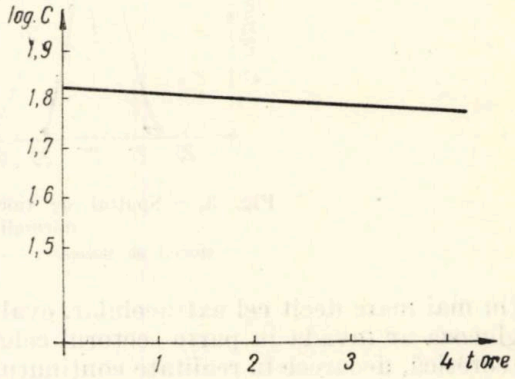


Fig. 1. — Evoluţia semilogaritmică a tiocianatului de sodiu. Pe abscisă sînt înscrise valorile timpului iar pe ordonată logaritmii concentraţiilor de tiocianat.

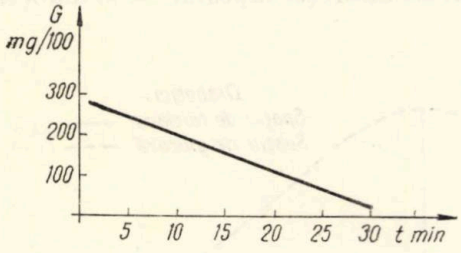


Fig. 2. — Valorile glicemiilor înscrise pe hîrtie semilogaritmică. Pe abscisă sînt înscrise valorile timpului iar pe ordonată valorile glicemiilor.

în care *Gl* reprezintă cantitatea de glucoză injectată exprimată în grame, $G(t_o + \varepsilon)$ este glicemia limită, iar G_o glicemia iniţială.

$\varepsilon \to 0$

Valorile referitoare la repartizarea glucozei şi tiocianatului în organism au fost interpretate statistic. Spaţiul de tiocianat şi cel de glucoză au fost exprimate în procente din greutatea corporală.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Studiul făcut la normali arată o mare asemănare între modul de repartiţie al glucozei şi al tiocianatului (fig. 3).

Valorile găsite de noi la normali se ridică la $20 \pm 3\%$ din greutatea corporală.

Cercetarea spaţiului de tiocianat şi glucoză la diabetici arată că existenţa unei perturbări în metabolismul glucidelor duce la obţinerea de valori crescute pentru spaţiul de glucoză, în comparaţie cu cel de tio-

cianat, ajungîndu-se uneori la valoarea de 50% din greutatea corporală pentru Sp Gl (fig. 4 şi tabela 1).

Spaţiul de glucoză fiind mult mărit la diabetici faţă de cel de tiocianat, am putea presupune că la diabetic glucoza difuzează într-un spa-

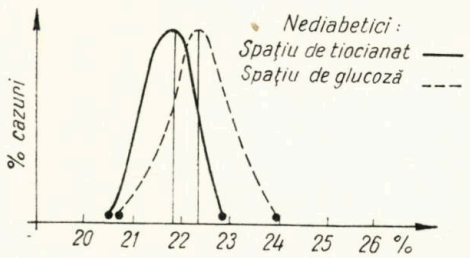


Fig. 3. — Spaţiul de tiocianat şi glucoză la normali:
—— spaţiul de tiocianat; – – – spaţiul de glucoză.

ţiu mai mare decît cel extracelular, evaluat prin tiocianat. Cu alte cuvinte, glucoza ar invada în parte sectorul celular. Această supoziţie rămîne pur teoretică, deoarece în realitate conţinutul celular în glucoză nu este crescut la diabetic. Această diferenţă de valori se datoreşte faptului că, la diabetic,

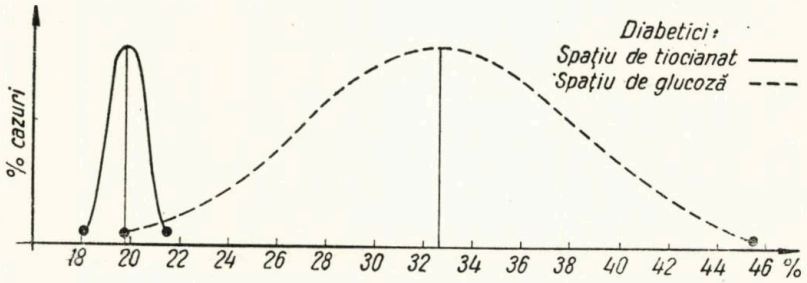


Fig. 4. — Spaţiul de tiocianat şi glucoză la diabetici:
—— spaţiul de tiocianat; – – – spaţiul de glucoză.

Tabela 1

Spaţiul de tiocianat şi glucoză la normali şi diabetici

Nr.	Caracterele grupei	Normali		Diabetici	
		Sp SCN^- %	Sp G %	Sp SCN^- %	Sp G %
1	Limitele întîlnite	19—26	19—31	14—28	20—48
2	Valoarea medie $\bar{x}$	22	22	20	33
3	Abatere standard a mediei	2,1	3	3	12
4	Variaţia	4,6	9,2	9	135
5	Abatere standard	1,1	1,6	1,6	13

glucoza nu este răspîndită omogen între diversele sectoare ale lichidelor extracelulare, fiind mai concentrată în interstiţii, lucru dovedit prin determinarea glicistiei, aşa cum se vede din tabela 2.

Tabela 2

Valorile glicemiei şi glicistiei la normal şi diabetic

Nr.	Nume	Vîrsta	$K.10^{-2}$	Sp G %	Sp R %	Glicemie	Glicistie	Dg
1	M.N.	47	0,36	28	25	4,0	4,4	Diabet
2	V.O.	52	0,25	40	22	1,2	1,6	,,
3	M.E.	63	0,16	34	20	1,4	1,8	,,
4	A.F.	31	1,20	20	19	1,0	1,0	Sănătos
5	B.P.	55	2,10	24	25	1,0	1,0	,,

CONCLUZII

Exprimarea volumului lichidelor extracelulare prin spaţiul de tiocianat şi glucoză la 45 normali a arătat că această valoare este în jurul cifrei de 20 $\pm$ 3% din greutatea corporală, valoare ce se situează în apropierea celor indicate în literatură. La diabetici, studiile făcute de noi pe un lot de 200 de bolnavi, au surprins diferenţe mari între spaţiul de glucoză şi cel de tiocianat, Sp Gl ajungînd uneori la valoarea de 50% din greutatea corporală. Această diferenţă se datoreşte faptului că la bolnavii cu dereglări ale metabolismului glucidic, glucoza nu se găseşte răspîndită omogen în toate sectoarele lichidelor extracelulare, ci este aglomerată în sectorul interstiţial.

Prezentat la redacţie la 13 februarie 1971

Clinica de boli de metabolism şi nutriţie, I.M.F., Spitalul ,,I. Cantacuzino'', Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. F. Manery, Phisiol. Rev., **34**, 334 (1964).
2. V. Conard, *Mesure de l'assimilation du glucose*, Ed. Acta Medica Belgica, 1955, Bruxelles.
3. R. Tarail, D. W. Seldin, A. V. N. Goodyer, J. Clin. Invest., **30**, 1111 (1951).
4. A. N. Wick, D. R. Drury, E. M. Mac Kay, Ann. New York Acad. Sci., **54**, 684 (1951).
5. H. C. Hagedorn, B. N. Jensen, Biochem. Z., **46**, 135 (1923).
6. R. Cachera, M. Lamotte, Sem. Hôp., Paris, **26**, 500 (1950).

ESTIMATION OF EXTRACELLULAR LIQUIDS BY SIMULTANEOUS DETERMINATION OF THE THIOCYANATE AND GLUCOSE SPACE. COMPARATIVE INVESTIGATION OF NORMAL AND DIABETIC SUBJECTS

SUMMARY

The values found with control subjects by determining the glucose space and the thiocyanate space, respectively, are about 20 $\pm$ 3 per cent of the body weight.

With the diabetics, we have found a distinct difference between these two values expressing the volume of the extracellular liquids, the glucose space having considerably higher values than those of thiocyanate.

We assume that this difference is due to the fact that during damages of carbohydrate the glucose is unevenly distributed among the various sectors of the extracellular liquids, being more concentrated in the interstitial one.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1. 55–61 (1972)

HIDROLIZA IMUNOGLOBULINEI G DE IEPURE CU CATEPSINĂ D PURIFICATĂ

SILVIA MIHĂESCU şi VICTOR GHEŢIE

Rezumat. — S-a urmărit efectul catepsinei D purificate, izolată din splina de iepure asupra IgG de iepure. S-a constatat apariţia unor fragmente de tip $F(ab')_2$ şi, Pep III'. Fragmentul $F(ab')_2$, purtător al situsului de combinare al anticorpilor, este rezistent la acţiunea catepsinei D. Fragmentul Pep III' poate fi desprins direct din molecula de IgG sau prin intermediul unui fragment Fc, cu o viaţă efemeră în hidrolizatele cu catepsină D. Atacul regiunii Fc poate fi facilitat de pH-ul scăzut al hidrolizei (3,5) care induce în această regiune schimbări de conformaţie, făcînd-o astfel mai susceptibilă la acţiunea catepsinei D.

Într-o lucrare anterioară am arătat că imunoglobulina G (IgG) de iepure poate fi degradată *in vitro* de către o fracţiune subcelulară bogată în lizozomi, izolată din splina de iepure [1]. Se obţin fragmente de tipul Fab, Fc şi Fc', similare cu cele ce rezultă în urma acţiunii papainei asupra IgG, la pH 5,5 [2]. S-a considerat că această scindare poate fi provocată de catepsina D, care pare a fi principala enzimă proteolitică a splenocitelor de iepure [3].

Deoarece s-a arătat că splina conţine cantităţi semnificative de catepsină B [4] şi urme de catepsină E [3], efectul proteolitic exercitat de fracţiunea lizozomală ar putea reprezenta, de fapt, o însumare a acţiunii celor trei enzime prezente aici. În favoarea acestei posibilităţi pot fi aduse experienţele noastre care au arătat că fragmentul Fc este distrus de fracţiunea lizozomală splenică, în prezenţa cisteinei [1]. Cum dintre catepsinele sus amintite numai catepsina B este cistein-dependentă, rezultă că scindarea mai avansată a fragmentului Fc este determinată de acţiunea catepsinei B. De altfel, această acţiune poate fi complet împiedicată prin adăugarea inhibitorilor catepsinei B [5].

Pentru a delimita rolul catepsinei D în scindarea IgG la nivelul splenocitelor, am întreprins lucrarea prezentă. S-a dovedit că acţiunea catepsinei D nu se suprapune peste aceea a fracţiunii lizozomale, ceea ce sugerează că la nivelul splinei există o cooperare între catepsine, care conduce la catabolizarea caracteristică a IgG [6].

MATERIAL ŞI METODĂ

Izolarea şi purificarea catepsinei D din splina de iepure. S-a pornit de la pulbere acetonică de splină. Pulberea s-a obţinut după indicaţiile date de Barrett [7]. Splinele, recoltate imediat după sacrificarea animalelor, s-au mărunţit bine cu foarfeca şi apoi s-au omogenizat într-un omogenizator de tip Potter, cu apă distilată. Operaţiile s-au efectuat la rece. Omogenatul s-a turnat peste 10 volume de acetonă bine răcită, sub agitare puternică pe un agitator magnetic. După 5 min de agitare, vasul s-a acoperit şi s-a lăsat la +4°C. A doua zi s-a decantat supernatantul, iar depozitul s-a spălat de 3—4 ori cu acetonă rece, lichidul de spălare îndepărtîndu-se de fiecare dată prin centrifugare la rece, 5 min la 4000 rot/min. După ultima decantare depozitul s-a întins în strat cît mai subţire pe pereţii eprubetei sau pe un capac Petri, ce s-a expus unui curent slab de aer, pentru îndepărtarea acetonei. Uscarea completă s-a realizat într-un exsicator cu $CaCl_2$, sub presiune scăzută, la rece. Pulberea astfel obţinută s-a păstrat la rece, pe $CaCl_2$, timp de mai multe luni, şi a servit ca material de extracţie a catepsinei D. Din 10 g ţesut umed s-au obţinut 1,6 g de pulbere.

Extracţia catepsinei D s-a făcut pornind de la 1g de pulbere acetonică de splină ce s-a suspendat, prin mojarare, la rece, în 20 ml tampon fosfat 0,05 M, pH 8,0 şi s-a lăsat o oră la rece. S-a decantat, iar depozitul s-a extras cu încă 10 ml din acelaşi tampon, încă o oră, la rece, apoi peste această suspensie s-a adăugat primul extract şi totul s-a dializat faţă de tampon fosfat 0,05 M, pH 8,0, la rece, peste noapte. A doua zi s-a centrifugat 20 min, la 10 000 rot/min.

Din supernatant, catepsina D s-a purificat, după Lapresle [8], prin cromatografieri succesive pe DEAE-celuloză (coloană 1,5×22 cm), cu tampon fosfat 0,05 M, pH 8,0, apoi pe CM-celuloză (coloană 1,5 × 22 cm), cu tampon fosfat 0,015 M, pH 6,75 şi, final, pe CM-Sephadex (coloană 1,5 × 24 cm), în două etape : cu tampon fosfat 0,015 M, pH 6,75 şi apoi cu acelaşi tampon plus NaCl 0,3 M. Prin cromatografierea pe CM-Sephadex se reduce de aproximativ 10 ori volumul în care se eluează enzima. Fracţiunea de la ultima eluţie, ce conţine catepsina D, s-a concentrat prin perevaporare, concomitent cu dializă faţă de apă distilată, pînă la 1 ml (circa 1 mg de proteină). Acest preparat de catepsină D purificată a avut o activitate specifică de 100 de ori mai mare decît extractul iniţial din pulberea acetonică. Prin acest procedeu de purificare s-a obţinut un preparat de catepsină D de 10 ori mai pur decît cel obţinut într-o lucrare anterioară printr-un alt procedeu, pentru izolarea catepsinei D din ficatul de şobolan [9].

Activitatea catepsinei D, în diferite etape de purificare, a fost determinată la pH 3,5, în tampon citrat-HCl 0,2 M, după metoda dată de Press şi colab. [10], dar fără adaos de cisteină, metodă folosită de noi într-o altă lucrare [9].

Prepararea IgG de iepure s-a făcut prin precipitarea unui amestec de ser de iepure, cu $(NH_4)_2SO_4$, pînă la o saturare finală de 33%, şi purificarea acestei fracţiuni prin trecere pe DEAE-celuloză, cu tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0 [11].

Prepararea fragmentelor Fab și Fc s-a făcut prin hidroliza IgG de iepure (200 mg) cu papaină, în tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0, 7 ore, după Porter [12]. Îndepărtarea IgG nehidrolizate s-a realizat prin gelfiltrarea hidrolizatului printr-o coloană de Sephadex G—150 (2 × 115 cm) cu tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0 ce conținea NaCl 0,2 M. Pentru separarea fragmentelor de hidroliză, piscul al doilea, ce cuprindea fragmentele Fab, Fc și Fc', s-a dializat față de tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5 și s-a cromatografiat pe CM-celuloză (coloană 1,5 × 23 cm), cu gradient continuu, folosind ca tampon final acid acetic-acetat de sodiu 0,8 M, pH 5,5 și un volum total de eluție de 900 ml. Probele din ultimul pisc s-au grupat astfel : ramura ascendentă, partea de vîrf, și ramura descendentă s-au dializat și liofilizat. Proteina de pe ramura ascendentă era formată în majoritate din fragmentul Fc'.

În unele cazuri s-a folosit la analizele imunoelectroforetice comparative IgG hidrolizată cu papaină în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1 M, pH 5,5, 21 de ore, după Putnam [13]. S-a utilizat hidrolizatul total.

Prepararea fragmentului $F(ab')_2$ s-a făcut prin hidroliza IgG de iepure (10 mg) cu pepsină, în tampon acetat 0,1 M, pH 4,5 și gel-filtrarea hidrolizatului pe Sephadex G—75 [14]. Proteina din primul pisc s-a concentrat și s-a folosit ca fragment $F(ab')_2$ în analizele de imunoelectroforeză comparativă.

Reducerea fragmentului $F(ab')_2$. Atît fragmentul peptic $F(ab')_2$ cît și fragmentul de tip $F(ab')_2$ rezultat din hidroliza IgG cu catepsină D s-au redus după indicațiile date de Utsumi și Karush [14]. La reducere s-a folosit β-mercaptoetanol 0,14 M, în loc de 0,014 M cum indică metoda, iar ca agent alchilant s-a utilizat iodacetamida 0,14 M.

Hidroliza IgG și a fragmentului Fc' cu catepsină D, s-a făcut în tampon citrat de sodiu-HCl 0,2 M, pH 3,5, la 37°C. Concentrația substratului, raportul enzimă/substrat (E/S) și durata hidrolizei au variat în funcție de analizele ulterioare. Astfel, pentru analizele de gel-filtrare și cromatografie condițiile au fost : IgG 1%, E/S = 1/50, 18—22 ore, pentru analizele imunoelectroforetice de urmărire a dinamicii de scindare a IgG : IgG 0,3%, E/S = 1/10, 1/50 și 1/100, 2, 6 și 22 de ore, iar pentru fragmentul Fc' : Fc' 0,25%, E/S = 1/10, 6 și 25 ore.

Gel-filtrarea pe Sephadex G—75 și G—150. Toate gel-filtrările au fost efectuate cu tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0 ce conținea NaCl 0,15 M și EDTA, 0,002M. Dimensiunile coloanelor sînt specificate în explicația figurilor.

Imunoelectroforeza s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal-veronal sodic, pH 8,6, $\mu = 0{,}016$ în plăci și 0,05 în cuvă. S-a aplicat un potențial de 6V/cm, cu o intensitate maximă de 1mA/cm, timp de 2 1/2 ore.

Dubla difuzie s-a executat după Ouchterlony, în gel de agaroză 1% în soluție salină fiziologică.

Ca antiseruri s-au folosit : ser de porc anti-fragmente (Fab + Fc) absorbit cu fragment Fab și neabsorbit (obținut prin bunăvoința dr. N. St. Chișiu de la Spitalul „Cantacuzino") și ser de oaie anti-fragment Fc (conține însă în cantitate mică și anticorpi anti-Fab).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Supunînd IgG de iepure la hidroliză cu catepsină D într-un raport E/S = 1/50, timp de 18 ore, şi gel-filtrînd hidrolizatul pe Sephadex G—150, se obţine profilul cromatografic din figura 1. Analiza imunoelectroforetică, de tip Osserman, a părţii ascendente (*I*) şi descendente (*II*) a piscului ce părăseşte primul coloana a semnalat prezenţa unui fragment cu antigenicitate Fab, alături de alte două componente cu antigenicitate Fc (fig. 2).

Deoarece proteina cu antigenicitate Fab este prezentă atît pe ramura ascendentă, cît şi pe cea descendentă a piscului şi are un volum de eluţie foarte apropiat de cel al IgG, pare posibil ca aici să fie un component cu greutate moleculară mai mare decît aceea a Fab, probabil $F(ab')_2$.

Pentru a testa această posibilitate s-a efectuat o gel-filtrare pe Sephadex G—75 a unui hidrolizat de IgG obţinut în condiţiile menţionate mai sus (fig. 3). Proteina de sub ramura ascendentă a piscului a fost concentrată, redusă şi alchilată, apoi recromatografiată pe aceeaşi coloană. Se observă că proteina îşi deplasează volumul de eluţie, de la cel corespunzător fragmentului $F(ab')_2$, la cel al fragmentului Fab. Rezultă că, în urma hidrolizei cu catepsină D, din molecula de IgG se desprinde un fragment de tip $F(ab')_2$, similar cu cel produs de pepsină.

În urma reducerii, fragmentul $F(ab')_2$ dobîndeşte o mobilitate electroforetică mai mare, fapt confirmat şi prin analiza pe CM-celuloză a hidrolizatului de IgG cu catepsină D. Cele două piscuri cromatografice separate prezintă antigenicitate Fab, avînd mobilităţi net diferite (fig. 4). Piscul *II* conţine fragmente de tip $F(ab')_2$, judecînd după mobilitatea sa electroforetică, similară cu aceea a fragmentului $F(ab')_2$ obţinut din IgG cu pepsină. În piscul *I*, care reprezintă mai puţin de 20% din total, este prezent fragmentul Fab', cu mobilitate electroforetică mai mare, rezultat, probabil, ca artefact de cromatografiere pe CM-celuloză, aşa cum a semnalat Nisonoff şi colab., pentru $F(ab')_2$ peptic [15], şi nu ca urmare a acţiunii catepsinei D.

În consecinţă putem considera că în urma acţiunii catepsinei D asupra IgG rezultă un fragment de tip $F(ab')_2$ care îşi conservă legătura disulfidică ce uneşte fragmentele Fd.

Desprinderea regiunii Fc este atestată de rezultatul analizei imunoelectroforetice, prezentat în figura 2, din care se observă apariţia a doi componenţi (notaţi *a* şi *b*) cu antigenicitate Fc.

Reacţiile de identificare, efectuate prin imunoelectroforeză sau dublă difuzie, au arătat că componentul *b* are o antigenicitate asemănătoare (dacă nu complet identică) cu aceea a fragmentului papainic Fc. Astfel, componentul *b* este mai sărac antigenic ca IgG, are determinanţi antigenici în plus faţă de fragmentul papainic Fc' şi dă o reacţie de identitate totală cu fragmentul Fc. Prezenţa componentului *b* în ramura ascendentă a curbei din figura 1 arată că el are o greutate moleculară mai mare decît componentul *a*. Componentul *a* prezintă, la imunoelectroforeză, o reacţie de identitate totală cu fragmentul papainic Fc' şi fragmentul peptic Pep III' (fig. 5).

Analiza imunoelectroforetică comparativă a celor doi componenţi, *a* şi *b*, dovedeşte că componentul *b* are determinanţi antigenici în plus

față de *a* (fig. 6), ceea ce este în acord cu identificările făcute anterior : componentul $a \simeq$ Pep III′, componentul b = Fc.

În piscul cromatografic III, din figura 1, este prezent un component cu antigenicitate Fc care nu a putut fi identificat cu nici unul din fragmentele peptice sau papainice cunoscute.

Reacția de identitate totală dintre componentul *a* și fragmentul Fc′, respectiv Pep III′, nu înseamnă că ele au aceeași mărime moleculară. Supunînd fragmentul papainic Fc′ acțiunii catepsinei D, nu se constată nici o modificare în mobilitatea și aspectul liniei de precipitare, ceea ce dovedește că componentul *a* este mai mare decît fragmentul papainic Fc′. Deoarece antiserul folosit de noi nu poate deosebi fragmentul Fc′ de Pep III′ [16], rezultă că componentul *a* ar putea fi asemănător (dacă nu chiar identic) cu fragmentul Pep III′, cu atît mai mult cu cît ele au mobilitate electroforetică foarte asemănătoare.

Dinamica apariției liniilor de precipitare pentru componentele *a* (Pep III′) și *b* (Fc) a fost urmărită prin efectuarea hidrolizei IgG cu catepsină D, la diferite rapoarte E/S și cu timpi de hidroliză diferiți (fig. 7).

Se constată că componentul *a* (Pep III′) apare chiar la un raport E/S = 1/100 și o incubare de 2 ore. Acest component pare rezistent la acțiunea catepsinei D, deoarece el se menține chiar dacă hidroliza se efectuează la un raport E/S = 1/10 și incubarea se prelungește la 22 ore. Singura modificare ce se constată (și la un raport E/S = 1/50 și 1/100) se referă la o schimbare netă a formei liniei de precipitare, care devine mai scurtă și mai bine conturată, ca și cum componentul ar fi devenit mai omogen. Această comportare ne face să bănuim că la prelungirea hidrolizei nu este exclusă desprinderea unor peptide din molecula componentului *a* (Pep III′).

Componentul *b* (Fc) nu a putut fi identificat cînd timpul de hidroliză s-a prelungit la 22 de ore, și nici cînd acesta a fost scurt, la rapoarte E/S = 1/50 și 1/100. Această comportare poate avea cel puțin două explicații :

1) Catepsina D produce scindarea IgG în două etape, desprinderea regiunii Fc și scindarea ei ulterioară pînă la Pep III′ ($IgG \xrightarrow{v_1} Fc \xrightarrow{v_2} PepIII'$). La începutul hidrolizei, viteza de desprindere a regiunii Fc (v_1) este mai mică decît viteza de scindare a ei în Pep III′ (v_2). În consecință, în amestecul de reacție nu se evidențiază decît Pep III′. Prin scăderea cantității de IgG, raportul relativ E/S crește, ceea ce poate face ca viteza desprinderii fragmentului Fc să depășească viteza scindării sale ulterioare, astfel că în amestecul de reacție poate fi semnalată prezența efemeră a fragmentului Fc. După desfacerea întregii cantități de Fc, v_1 se anulează și întreg fragmentul Fc trece în Pep III′, astfel că în hidrolizat nu mai poate fi semnalat decît Pep III′. 2) IgG de iepure este o populație eterogenă, care poate conține molecule ce se scindează în succesiunea IgG → Fc → Pep III′, și altele din care fragmentul Pep III′ se desprinde direct din IgG. Dacă populația de molecule din care Pep III′ se elimină direct este majoritară, rezultă că apariția fragmentului Fc, din celelalte molecule, nu va putea fi observată decît atunci cînd cea mai mare parte din moleculele de IgG, din care Pep III′ se desprinde direct, vor fi consumate. Acest lucru pare posibil, știind că producția Pep III′ prin desprindere directă este mai rapidă decît prin intermediul Fc, astfel că poate exista un moment în care prezența Fc să poată fi detectată.

Chiar dacă explicaţiile date mai sus nu ar fi conforme realităţii, datele noastre experimentale arată, fără îndoială, că din regiunea Fc a moleculei de IgG catepsina D desprinde un fragment foarte asemănător cu fragmentul peptic Pep III'. Alături de acest fragment pot exista şi altele, care însă nu au putut fi identificate, fiind lipsite de determinanţi antigenici recognoscibili prin serul folosit de noi.

Aceste rezultate, coroborate cu cele obţinute de Rangel şi Lapresle [17] la scindarea lanţului B al insulinei cu catepsine şi pepsină, sau de Lapresle şi colab. [18] la scindarea albuminei serice umane cu catepsine şi pepsină, arată că specificitatea catepsinei D este asemănătoare cu a pepsinei. Deoarece această specificitate, testată pe lanţul B al insulinei, apare mai restrînsă, s-ar putea ca şi în cazul regiunii Fc catepsina D să hidrolizeze mai puţine legături peptidice, astfel că rezultă un număr mai redus de fragmente.

Faptul că regiunea Fc poate fi degradată mai avansat de catepsina D, în comparaţie cu papaina, s-ar datora nu numai specificităţii de acţiune diferită a celor două enzime, ci, mai ales, pH-ului acid (3,5) la care se efectuează hidroliza cu catepsină D. Acest pH induce în regiunea Fc o tranziţie de conformaţie [19], care descoperă în lanţul polipeptidic noi puncte de atac pentru catepsină.

Comparînd acţiunea catepsinelor D şi E [20] asupra IgG de iepure se constată că ambele scindează molecula de IgG eliberînd fragmente de tip $F(ab')_2$, asemănătoare cu cele rezultate din acţiunea pepsinei. Regiunea Fc este atacată în mod diferit de cele două enzime. Catepsina E micşorează fragmentul Fc la un component mai sărac antigenic decît fragmentul papainic Fc', fapt probat prin capacitatea catepsinei E de a ataca fragmentul papainic Fc' şi de a-l reduce la un fragment mai mic (rFc'), care pare să reprezinte miezul rezistent al regiunii Fc la acţiunea catepsinei E. Catepsina D nu este capabilă de a ataca fragmentul papainic Fc', ea desprinzînd din regiunea Fc un component cu proprietăţi fizico-chimice şi imunochimice foarte asemănătoare acelora ale fragmentului Pep III', care poate reprezenta, deci, miezul rezistent al regiunii Fc la acţiunea catepsinei D. Se poate conchide că, dintre cele două enzime, catepsina D are o specificitate mai îngustă decît catepsina E.

Confruntarea acestor rezultate cu cele obţinute prin hidroliza IgG cu fracţiunea lizozomală, bogată în catepsină D, din splina de iepure, arată că singură acţiunea catepsinei D nu dă seama de efectele constatate cu fracţiunea lizozomală. În timp ce fracţiunea lizozomală produce fragmente Fc şi Fc' tipice, primele dispărînd prin adăugarea cisteinei, acţiunea catepsinei D se opreşte la un fragment de tip Pep III', care, în orice caz, este mai mare decît fragmentul Fc' obţinut cu fracţiunea lizozomală. De aceea, pare verosimil să presupunem că în lizozomii din splină catepsina B este, în primul rînd, responsabilă pentru efectul hidrolitic constatat.

Degradarea intralizozomală a imunoglobulinelor captate de către celulele implicate în catabolizarea lor pare a fi un rezultat al acţiunii succesive, sau concomitente, a proteazelor din sistemul cateptic, prezente aici.

Este interesant de notat că acest fenomen este observabil şi la compararea efectului catepsinei E cu cel al granulelor lizozomale provenite din leucocitele polimorfonucleare [21]. Se constată că efectul hidrolitic

al granulelor lizozomale din polimorfonucleare este mai complet, în hidrolizate semnalîndu-se doar prezenţa fragmentului de tip Fab', pe cînd cu catepsina E se menţine o cantitate mică, dar semnificativă, de fragment rFc'. Şi în acest caz distrugerea rFc' la nivelul granulelor lizozomale din polimorfonucleare ar putea fi rezultatul acţiunii celorlalte catepsine.

CONCLUZII

Sub acţiunea catepsinei D purificate, IgG de iepure este scindată la fragmente de tip $F(ab')_2$ şi Pep III', asemănătoare cu cele rezultate din acţiunea pepsinei.

Prezentat la redacţie la 19 octombrie 1971

Laboratorul de imunochimie,
Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. C. Motaş, V. Ghetie, Immunochemistry, **6**, 547 (1969).
2. V. Ghetie, C. Motaş, S. Mihăescu, Rev. roum. Biochim., **6**, 29 (1969).
3. J. Štefanovič, T. Webb, C. Lapresle, Ann. Inst. Pasteur, **103**, 276 (1962).
4. J. M. W. Bouma, M. Gruber, Biochim. Biophys. Acta, **89**, 545 (1964).
5. C. Motaş, V. Ghetie, S. Mihăescu, St. cerc. biochim., **14**, 171 (1971).
6. V. Ghetie, S. Mihăescu, L. Buzilă, Primul Simpozion Naţional de Imunologie, Bucureşti, 1971, Rezumate p. 30 (127).
7. A. J. Barrett, Biochem. J., **104**, 601 (1967).
8. C. Lapresle, în Tissue proteinases, ed. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-Londra, 1971, p. 135.
9. S. Mihăescu, St. cerc. biochim., **13**, 155 (1970).
10. E. M. Press, R. R. Porter, J. Cebra, Biochem., J., **74**, 501 (1960).
11. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. Biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
12. R. R. Porter, Biochem., J., **73**, 119 (1959).
13. E. W. Putnam, M. Tan, L. T. Lynn, C. W. Easley, S. Migita, J. Biol. Chem., **237**, 717, (1962).
14. S. Utsumi, F. Karush, Biochemistry, **4**, 1766 (1965).
15. A. Nisonoff, F. C. Wissler, L. N. Lipman, Science, **132**, 1770 (1960).
16. C. Dragomirescu, St. cerc. biochim., **13**, 257 (1970).
17. H. Rangel, C. Lapresle, Biochim. Biophys. Acta, **128**, 327 (1966).
18. C. Lapresle, M. Kaminski, C. E. Tanner, J. Immunol., **82**, 94 (1959).
19. P. A. Charlwood, S. Utsumi, Biochem. J., **112**, 357 (1969).
20. S. Mihăescu, S. Gheţie, St. cerc. biochim., **14**, 163 (1971).
21. V. Gheţie, A. Sulica, Immunochemistry, **7**, 175 (1970).

HYDROLYSIS OF RABBIT IMMUNOGLOBULIN G BY PURIFIED CATHEPSIN D

SUMMARY

The action of purified cathepsin D, isolated from rabbit spleen, upon rabbit IgG was pursued. The appearance of some fragments of $F(ab')_2$ and Pep III' type was observed. The $F(ab')_2$ fragment, carrier of antibody combining sites, is resistant to cathepsin D action. The Pep III' fragment can be taken down from the IgG molecule either directly or *via* Fc fragment with short life in the cathepsin D digest. The Fc region attack can be facilitated bythe low pH of hydrolysis (3.5) which induces conformational changes in this region rendering it more sensitive to the cathepsin D action.

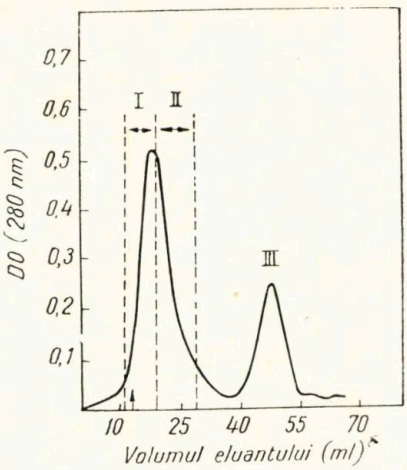


Fig. 1. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—150 a IgG de iepure (8 mg) hidrolizată cu catepsină D, la un raport E/S=1/50, timp de 18 ore. Coloană: 1 × 80 cm. Săgeata indică punctul maxim al eluţiei IgG.

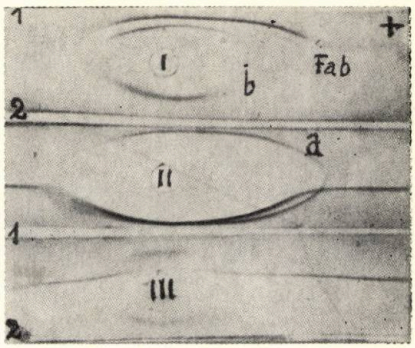


Fig. 2. — Imunoelectroforeza de tip Osserman a componentelor obţinute prin gel-filtrarea pe Sephadex G—150 a IgG hidrolizată cu catepsină D (fig. 1). *I*: ramura ascendentă şi *II*: ramura descendentă a primului pisc; *III*: piscul al doilea. Antiseruri: ser de porc anti-fragmente (Fab + Fc) neabsorbit (*1*) şi absorbit (*2*). Serul absorbit conţine un exces de fragment Fab.

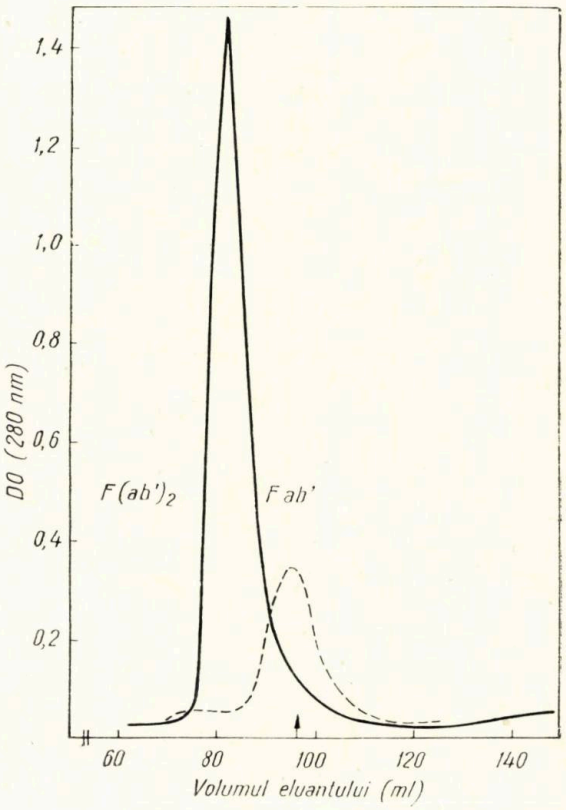


Fig. 3. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—75 a IgG de iepure (30mg) hidrolizată cu catepsină D la un raport E/S: 1/50, 17 ore (linia continuă) şi a fragmentului de tip $F(ab')_2$ redus şi alchilat (linia întreruptă). Coloană: 1,5 × 153 cm). Săgeata indică punctul maxim al eluţiei fragmentului Fab.

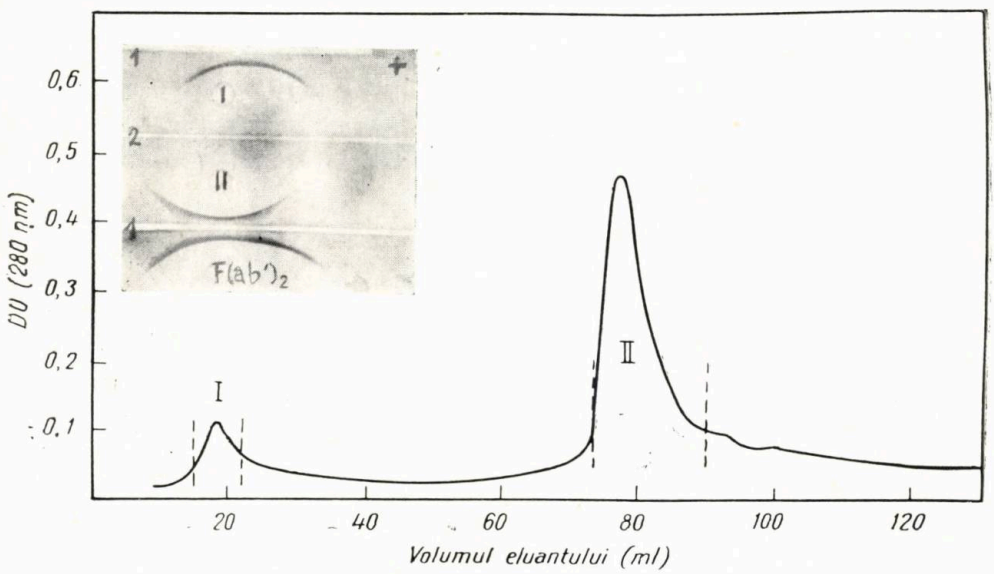


Fig.4. — Cromatografia pe CM-celuloză a IgG de iepure (30 mg) hidrolizată cu catepsină D la un raport E/S = 1/50, 18 ore. Înserat : imunoelectroforeza componentelor separate pe CM-celuloză și a fragmentului peptic $F(ab')_2$. Antiseruri : ser de porc anti-fragmente (Fab + Fc) neabsorbit (*1*) și absorbit (*2*).

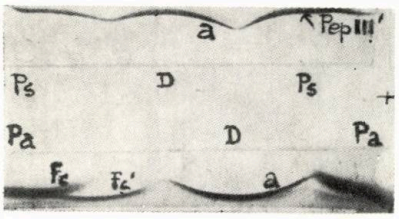
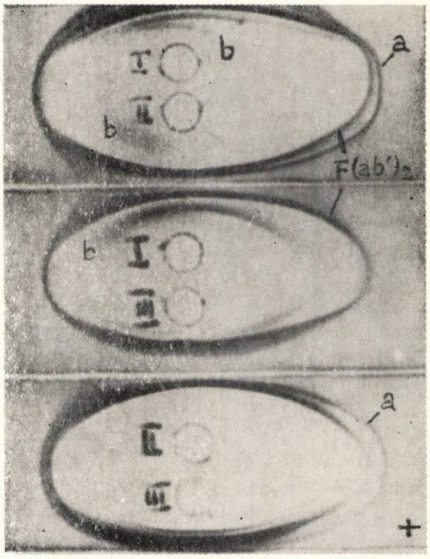


Fig. 5. — Identificarea imunoelectroforetică a componentului *a*, cu fragmentele Fc′ și Pep III′. Hidrolizat total de IgG cu : catepsină D la E/S = 1/50, 21 ore (D), pepsină la E/S = 1/50, 18 ore (Ps) și papaină la E/S = 1/100, 21 ore (Pa). Antiser : ser de oaie anti-fragment Fc (conține cantități mici de anticorpi anti-Fab).

Fig. 6. — Imunoelectroforeza comparativă a componentelor obținute prin gel-filtrarea pe Sephadex G—150 și a IgG hidrolizată cu catepsină D (fig. 1). *I* : ramura ascendentă și *II* : ramura descendentă a primului pisc ; *III* : piscul al doilea. Antiser : ser de porc anti-fragmente (Fab + Fc) neabsorbit.



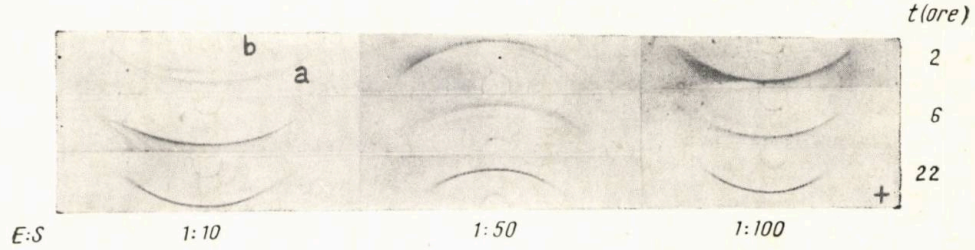


Fig. 7. — Dinamica scindării IgG de iepure cu catepsină D, urmărită imunoelectroforetic. S-a analizat hidrolizatul total. Antiser : ser de porc anti-fragmente (Fab + Fc) absorbit.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 63–71 (1972)

STUDII ASUPRA ECHILIBRULUI SH ⇌ SS ÎN MEDII BIOLOGICE

I. REACȚIA DINTRE DTNB ȘI GRUPĂRILE SH ALE PROTEINELOR SERICE*

RADU OLINESCU și ILCA MĂRGINEANU

Rezumat. — Reacția dintre DTNB și proteinele serice se compune din două etape : prima, de aproximativ 3 minute, în care reactivul reacționează cu grupările SH superficiale ale proteinelor, urmată de o altă etapă, mai lungă, în care se produce o denaturare a proteinei cu expunere treptată a altor grupări SH. Reacția studiată este dependentă de pH, temperatură, concentrația DTNB, natura proteinei și prezența ionului de Fe sau a hemoglobinei. Această reacție ar putea pune în evidență reactivitatea proteinelor plasmatice individuale.

Grupările sulfhidril ale proteinelor joacă un mare rol în procesele biochimice, iar oxidarea lor reversibilă sau ireversibilă constituie una dintre consecințele cele mai cunoscute ale acțiunii radiațiilor ionizante asupra substanțelor cu importanță biologică [1].

Reacția de formare a disulfurilor mixte între grupările SH ale radioprotectorilor și acelea ale proteinelor umorale sau celulare a format obiectul a numeroase studii *in vivo* sau *in vitro*, și după Phil și Eldjarn stă la baza radioprotecției [2]. Cu toate că ipoteza autorilor norvegieni a fost mult discutată, ea rămîne totuși pînă în prezent cea mai plauzibilă explicație a mecanismului de radioprotecție chimică.

În acest sens am studiat formarea unor disulfuri mixte între grupările SH ale unor radioprotectori sau proteine cu DTNB. Acest reactiv specific grupărilor SH, introdus de Ellman [3], este mult folosit pentru determinarea cantitativă a grupării tiol în stare redusă, deoarece formează disulfuri de tipul proteină-MNB, pe calea schimburilor SH ⇌ SS cu eliberare concomitentă de MNB. Astfel de reacții sînt mai rapide cu ioni mercaptan avînd un caracter nucleofil decît cu mercaptani nedisociați.

Indiferent de calea de administrare a radioprotectorilor, aceștia vin în contact în foarte scurt timp cu proteinele din serul sanguin. În această lucrare a fost studiată reacția dintre DTNB și grupările SH ale acestor proteine.

---

* Prescurtări: DTNB = 5,5′-ditio-bis-(2-nitrobenzoat); MNB = 5 mercapto-2-nitrobenzoat.

MATERIAL ŞI METODĂ

DTNB, hemoglobina, serum albumina şi unii radioprotectori ca glutationul redus, L cisteina, au fost folosiţi în puritate analitică (NBC).

S-a folosit ser uman, nehemolizat, obţinut după centrifugarea şi separarea sîngelui mai multor pacienţi fără reumatism sau insuficienţă hepatică.

Mediul de reacţie a fost de obicei compus din DTNB (5.10^{-5} M), ser (1 ml) şi tampon fosfat 0,066 M, pH 7,3. Volumul total a fost totdeauna 3 ml. Produsul reacţiei, MNB, a fost determinat prin măsurarea absorbţiei la 418 mμ, în cuvă de 1 cm la un spectrofotometru Beckman DK termostatat la 28°C. De cîte ori s-a lucrat pe ser (1 ml), drept martor s-a folosit aceeaşi cantitate de ser (1 ml) şi 2 ml tampon.

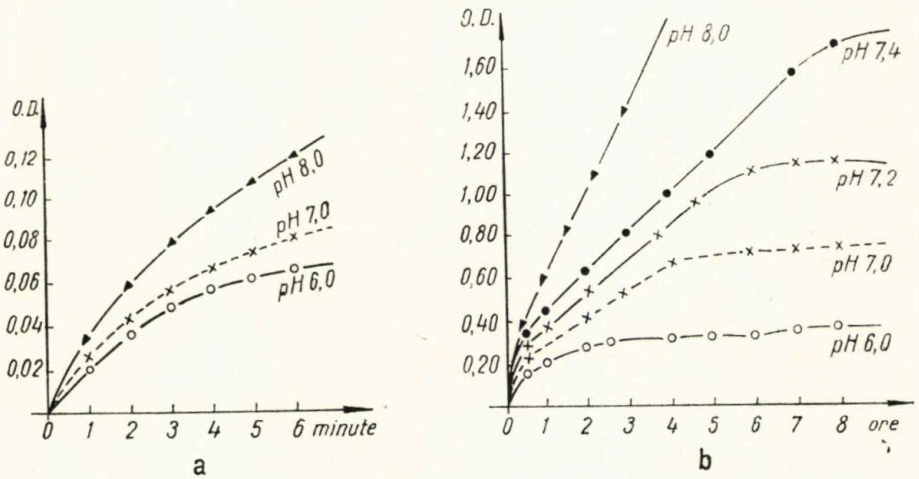


Fig. 1. — Reacţia dintre DTNB şi proteinele serice (ser recoltat de la o singură persoană) la diferite valori de pH:
a—pînă în 6 minute; *b*—pînă la 8 ore.

REZULTATE

Influenţa pH. DTNB este larg folosit pentru determinarea cantitativă a grupării SH şi foarte puţin pentru cinetică sau diferenţierea tiolilor din componenţa unei proteine. Amintim în acest sens lucrarea lui Boross pentru evidenţierea grupărilor SH reactive ale gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazei [4]. Astfel, se ştie că reacţia DTNB sau a altor reactivi cu grupare tiol este dependentă de pH, valoarea optimă fiind în jur de 8,5, datorită ionizării grupei SH. Prin folosirea pH 7,3, cel fiziologic, reacţia de formare a disulfurii mixte protein-MNB va fi mai lentă, absorbţia finală a compusului rezultat fiind aceeaşi [4]. Prin folosirea pH-ului fiziologic reacţia va fi mai uşor studiată şi extrapolată la condiţiile organismului, iar în plus vor putea fi puse în evidenţă diferitele grupări SH ale unei proteine în funcţie de poziţia sterică şi, deci, de gradul diferit de reactivitate.

În figura 1 este prezentată cinetica reacției DTNB cu proteinele serului de om la diferite valori de pH. Se observă că reacția propriu-zisă se desfășoară în două etape. O primă etapă (fig. 1 *a*) ce durează aproximativ 3 minute, în care reacția este de ordinul unu față de concentrația SH. Urmează apoi o a doua etapă, în care reacția este aparent de ordinul zero. Timpul cît durează reacția și valoarea maximă pentru un ser de la o persoană depind de valoarea pH-ului (fig. 1*b*) și sînt, evident, mult mai mari pentru valori mai alcaline ce se apropie de pH-ul optim.

Pentru prima perioadă a reacției, la valoarea pH-ului fiziologic se observă mari variații individuale atît în valorile absorbției (eliberare de MNB echivalentă numărului de grupări SH), cît și în viteza reacției, fapt ce face dificilă calcularea unor constante cinetice generale.

Reacția dintre DTNB și compuși tiolici cu greutate moleculară mică de tipul cisteinei sau glutationului este liniară pentru o gamă de concentrații între 1.10^{-6} și 5.10^{-5} M $\frac{\text{DTNB}}{\text{R}-\text{SH}}$. La pH 7,3, în primele trei minute se pun în evidență, în general, aproximativ 10 μ moli/ml ser, dar după cum am amintit variațiile individuale sînt foarte mari.

Influența componenților. Reacția proteinelor serice cu DTNB este desigur mai complicată datorită complexității calitative. Folosind o serie de proteine purificate ca serum albumine sau diferite enzime ca lactico-dehidrogenaza, gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza, se obține aceeași formă cinetică a reacției și aceeași comportare față de diferite valori ale pH-ului.

În figurile 2 și 3 este prezentată comportarea serum albuminei umane. Se observă în figura 3 că pînă la o valoare de 30 mg/ml reacția decurge liniar, iar la concentrații mai mari apar impedimente de ordin steric. Aceasta este mai evident în figura 2, unde forma curbei este sigmoidală, sugerînd pentru valori mai mici un efect cooperativ. Reacția grupărilor SH de la suprafața proteinei cu DTNB produce probabil o denaturare pe calea unor conformații treptate, ce facilitează contactul altor grupări SH din structura secundară a proteinei. Curbe asemănătoare s-au obținut și cu alte proteine purificate. Domeniul de concentrație diferă însă în funcție de natura proteinei. Concentrația DTNB este importantă, deoarece o reacție liniară la pH-ul fiziologic se obține pînă la concentrația de 5.10^{-5}M (fig. 4).

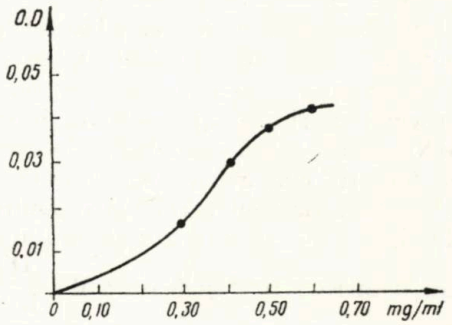
La concentrații mai mari în DTNB viteza reacției este mai mare. Noi am folosit concentrația de 5.10^{-5} M DTNB deoarece în cazul unor radioprotectori ca glutationul sau cisteina, în concentrații echimoleculare, reacția este liniară pînă la această valoare, obținîndu-se citirea densității optice într-un domeniu accesibil.

Influența fierului. Se știe că reacția dintre grupările tiol ale proteinelor și reactivii specifici, printre care se numără și DTNB, este influențată de mai mulți factori ca pH-ul, temperatura (de care ne vom ocupa într-o notă următoare), dar și de agenți oxidanți, dintre care, ținînd seama de concentrația fiziologică, menționăm fierul. Acțiunea stimulatorie a ionilor de Fe este prezentată în figurile 5 și 6.

Ionii Fe^{2+} și Fe^{3+} reacționează direct cu DTNB (fig. 5), eliberarea de MNB fiind sesizabilă de la o concentrație mai mare de 10 μg/ml, ceea ce înseamnă de 10 ori mai mult decît concentrația fiziologică. Diferențele

între ionii Fe^{2+} şi Fe^{3+} sînt minime în reacţia cu DTNB. În figura 6 este arătată acţiunea ionului Fe^{3+} şi prezenţa unui ser cu o concentraţie iniţială de 1 μg/ml. Prezenţa ionilor de Fe influenţează foarte mult reacţia grupărilor SH ale proteinelor cu DTNB încă din primele minute, atît

Fi.g 2. — Comportarea albuminei serice umane în reacţia cu DTNB la pH 7,3, după 10 minute.



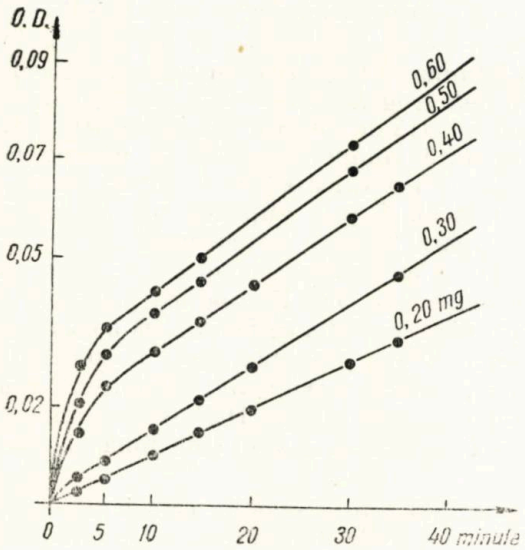


Fig. 3. — Influenţa diferitelor concentraţii de serum albumină asupra cineticii reacţiei cu DTNB.

în ceea ce priveşte valorile MNB eliberat, cît şi cinetica reacţiei, modificîndu-i viteza, mai ales după 30—40 minute. Reacţia dintre grupările SH ale proteinelor serice sau purificate şi DTNB nu este totuşi mult influenţată, ţinînd seama de limitele concentraţiei fiziologice a fierului sau chiar de cele patologice (maximum 3—4 μg/ml). De altfel, la concentraţii mai mari de 5 μg/ml Fe, acesta va precipita în contact cu ionii fosfat din ser.

Ionii Cu^{2+} şi Cu^{+} nu produc această stimulare nici în concentraţie de 10 ori mai mare decît nivelul fiziologic (aproximativ 1 μg/ml).

Acţiunea oarecum specifică a Fe asupra formării MNB este întărită şi prin efectul inhibitor al EDTA asupra acestei reacţii (fig. 7). Se poate observa că EDTA reduce doar valoarea eliberării MNB din prima perioadă

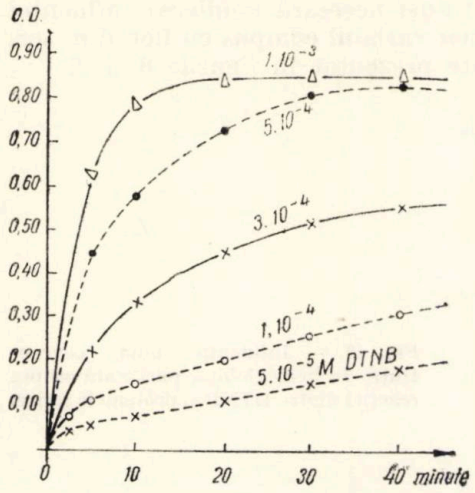


Fig. 4. — Influenţa diferitelor concentraţii de DTNB asupra reacţiei cu proteinele serice.

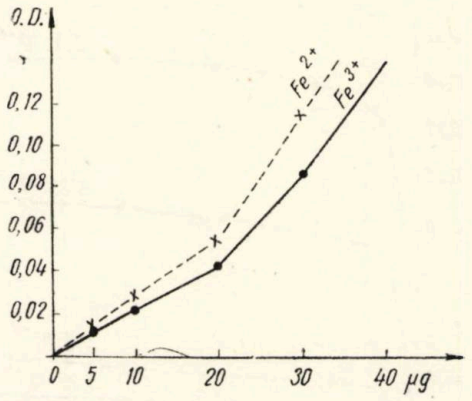


Fig. 5. — Reacţia dintre ionii Fe şi DTNB. Reactanţi numai Fe şi DTNB în apă, volum final 3 ml.

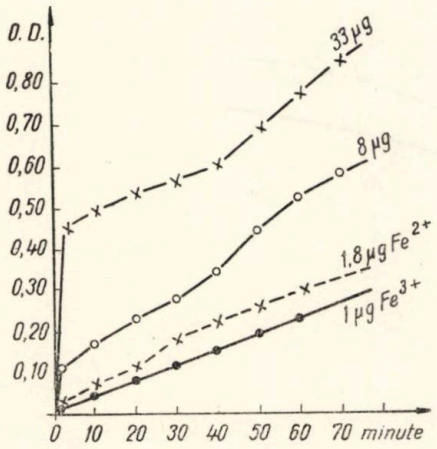


Fig. 6. — Efectul diferitelor concentraţii de Fe^{3+} asupra cineticii reacţiei DTNB cu proteinele serice.

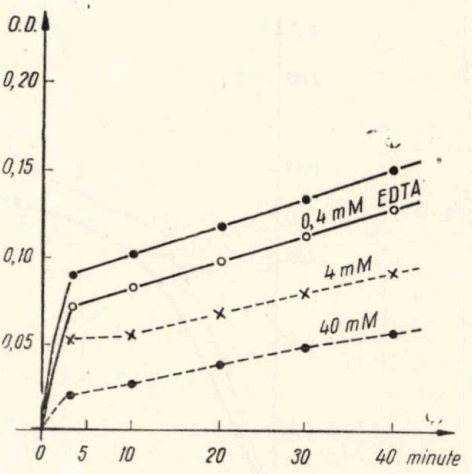


Fig. 7. — Efectul inhibitor al EDTA asupra reacţiei dintre DTNB şi proteinele serice.

a reacţiei neinfluenţînd apoi viteza de reacţie din a doua etapă. Aceste rezultate indică o contribuţie mică, dar sigură, a ionilor de Fe asupra valorii MNB eliberat în prima perioadă a reacţiei, de ordinul a 1—2 μ moli MNB. Acţiunea ionilor de Fe din perioada a doua a reacţiei dintre grupările SH ale proteinelor serice şi DTNB se datoreşte denaturării proteinei (fig. 7).

Concentraţia fierului seric este menţinută destul de constantă. Chiar în cazuri patologice nivelul sideremiei nu va atinge valori care să influen-

ţeze prea mult această reacţie. Este totuşi necesară studierea influenţei hemoglobinei, ca cel mai obişnuit şi mai variabil compus cu fier din **ser.** Efectul stimulator al hemoglobinei este prezentat în figurile 8 şi 9.

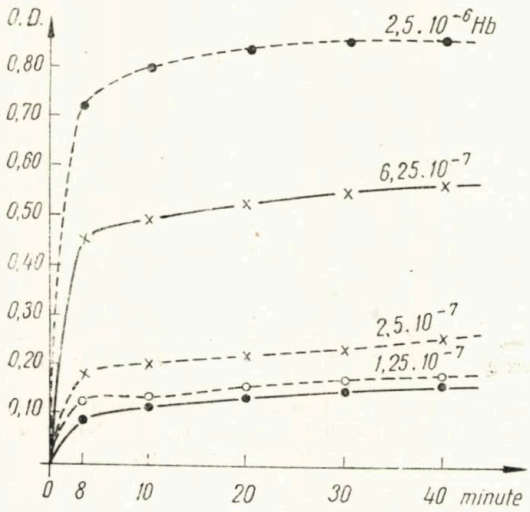


Fig. 8. — Influenţa unor concentraţii de hemoglobină purificată asupra reacţiei dintre DTNB şi proteinele serice.

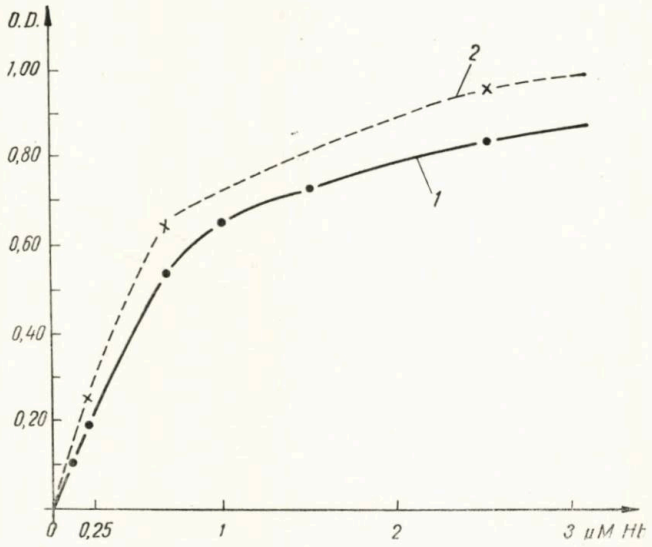


Fig. 9. — Acţiunea stimulatorie a hemoglobinei asupra eliberării MNB după 3 minute (1) şi după 30 minute (2).

Şi în acest caz, acţiunea acestui compus ce conţine fier se produce în primele 2—3 minute, în funcţie de concentraţie, după care reacţia decurge cu viteză constantă. Această stimulare se datoreşte unui surplus de grupări SH ale hemoglobinei. Ne-am putea aştepta, conform datelor din figura 7, ca prezenţa hemoglobinei, mai ales în cazul unui ser mult hemolizat, să crească foarte mult valorile eliberării MNB după 2—3 mi-

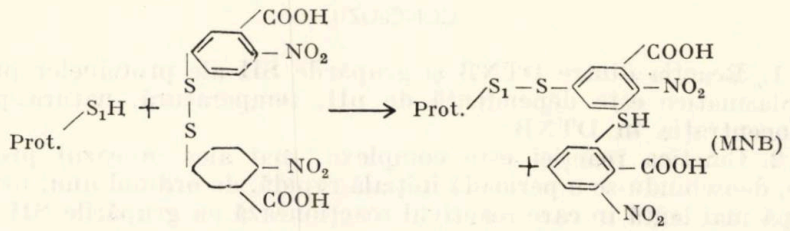
nute. Deşi este evidentă în cazul unor concentraţii mici (fig. 9), în cazul unor valori mai mari de 1 μM, această influenţă scade datorită probabil, unui impediment steric.

DISCUŢII

Reactivii grupării SH sînt mult folosiţi pentru studiul mecanismului de acţiune al unor enzime, prezenţei unor centri catalitici, sau în studiul conformaţionării unor proteine. Faţă de alţi reactivi ai grupării SH, folosirea DTNB are avantajul unei mai mari specificităţi comparativ cu N-etil-maleimidă (NEM) sau a unei mai mari solubilităţi, faţă de *para*-cloro-mercuribenzoat (PCMB). Ca şi ceilalţi reactivi ai grupării SH, DTNB are un pH optim în jur de 8,5 deoarece viteza de reacţie creşte în funcţie de ionizarea grupării SH, S^- fiind forma reactivă [5].

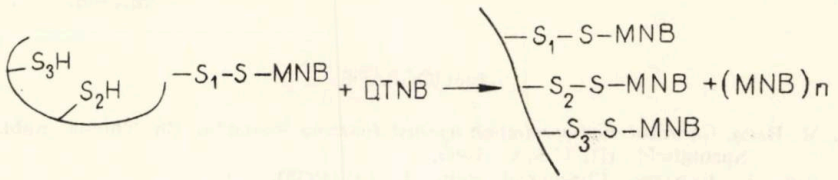
Reacţia DTNB cu un amestec complex de proteine (proteinele serice) sau proteine purificate este destul de complicată fiind influenţată de pH, temperatură, concentraţiile în DTNB, în numărul şi accesibilitatea grupărilor SH ale proteinei respective, cît şi de prezenţa ionului Fe sau hemoglobinei.

La pH 7,3, apropiat celui fiziologic, reacţia dintre DTNB şi proteinele purificate va depinde de natura proteinei, în special de grupările SH superficiale. În cazul proteinelor serice, la temperatură constantă, reacţia este de ordinul unui timp de 2—3 minute, cu variaţii individuale datorită stării conformaţionale ale proteinelor serice la momentul dat (peste 60%) şi prezenţei hemoglobinei sau a fierului (20%). Schematic această etapă se poate prezenta astfel:



Datorită prezenţei fierului şi hemoglobinei, valoarea extincţiei citită la 418 mμ în urma eliberării MNB este destul de aproximativă, mai mult orientativă.

Urmează apoi etapa a doua a reacţiei, în care, datorită blocării grupelor SH de pe suprafaţa proteinelor, acestea devin susceptibile unor conformaţionări, denaturări cu expunerea treptată a grupelor tiol din structura secundară şi primară, viteza reacţiei fiind de ordinul zero.



Reacţia se va opri o dată cu consumarea completă a reactivului sau a grupelor SH ce pot fi expuse.

Această reacţie a mai fost folosită într-o încercare de testare a afecţiunilor reumatismale datorite unor eventuale modificări ale proteinelor tisulare [6].

Rezultatele prezentate, deşi semnificative în unele cazuri (autorii apreciau diferenţe în absorbţie dintre primele două minute), nu au permis extinderea acestei metode.

Lucrarea de faţă, iniţiată în scopul studierii mecanismului de acţiune al radioprotectorilor, a arătat complexitatea modelului experimentat. Reacţia dintre DTNB şi proteinele serice executată în condiţii constante de temperatură şi la pH fiziologic va putea fi folosită atît în studiul conformaţional al unor proteine purificate, cît şi al unui amestec de proteine.

În cazul proteinelor serice, ale căror funcţii multiple nu sînt în totalitate cunoscute, această reacţie va putea fi corelată cu felul şi gravitatea unor maladii sau cu eficacitatea tratamentului. Reacţia studiată ţine seama de variaţia individuală şi ar putea permite urmărirea evoluţiei unui tratament, cu atît mai mult cu cîte multe medicamente sînt transportate în organism pe calea unor combinaţii labile cu proteinele serice, sub forma unor disulfuri mixte; acest fapt fiind demonstrat pentru radioprotectori [1].

Modelul nostru experimental formează o metodă avantajoasă de studiu al unor combinări labile ale unor proteine ca enzime sau albumine cu glutationul redus [7], în cursul reducerii acestora.

Într-o notă următoare vom prezenta acţiunea temperaturii şi a radiaţiilor ionizante asupra acestei reacţii.

CONCLUZII

1. Reacţia dintre DTNB şi grupările SH ale proteinelor purificate sau plasmatice este dependentă de pH, temperatură, natura proteinei şi concentraţia în DTNB.

2. Cinetica reacţiei este complexă, mai ales în cazul proteinelor serice, deosebindu-se o perioadă iniţială rapidă, de ordinul unu, urmată de o etapă mai lentă în care reactivul reacţionează cu grupările SH ale proteinei denaturate.

3. Deşi ionii Fe şi mai ales hemoglobina pot influenţa reacţia, acţiunea lor este secundară faţă de comportarea individuală a proteinelor plasmatice.

Prezentat la redacţie la 28 iunie 1971

Spitalul clinic Fundeni,
Secţia radiobiologie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Z. M. Bacq, *Chemical Radioprotection against Ionizing Radiation*, Ch. Thomas publ., cap. I Springfield III, U.S.A., 1965.
2. A. Pihl, L. Eldjarn, Pharmacol. Rev., **4**, 10 (1958).

3. G. L. Ellman, Archiv. Biochem. Biophys., **82**, 70 (1959).
4. L. Boross, Acta bioch. biophys., **4**, 57 (1969).
5. I. L. Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. II, Academic Press, New York, 1966, p. 635.
6. M. Butler, T. Gianmia, D. I. Cargill, F. Papick, B. G. Steinmetz, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **132**, 484 (1969).
7. F. J. Hird, Biochem. J., **85**, 2 (1962).

STUDIES ON THE SH ⇌ SH EQUILIBRIUM IN BIOLOGICAL MEDIA
I. THE REACTION BETWEEN DTNB AND SH GROUPS OF SERUM PROTEINS

SUMMARY

The reaction between DTNB and serum proteins takes place in two steps : the first one, lasting approximately 3 minutes, where the reagent reacts with superficial SH groups of proteins. This step is followed by a slow reaction, when a denaturation of protein occurs with gradual exposure of other SH groups.

The reaction is dependent on pH, temperature, concentration of DTNB, nature of protein and the presence of Fe ions or hemoglobin.

The whole reaction might be applied to the estimation of the individual reactivity of serum proteins.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 73–77 (1972)

RELAȚIA DINTRE PIRUVEMIE, PIRUVURIE ȘI ACTIVITATEA DECARBOXILAZEI PIRUVICE DIN FICAT ȘI CREIER LA ȘOBOLANI HRĂNIȚI CU FĂINURI DE EXTRACȚIE DIFERITĂ

FELICIA POPESCU și VIORICA GORCEA

Rezumat. — 141 șobolani au fost hrăniți cu făinuri de extracție diferită. Paralel cu micșorarea gradului de extracție a scăzut tiaminuria (de aproximativ 2,5 ori la cei hrăniți cu făină albă de 0—10% față de cei cu făină integrală), s-a redus activitatea piruvatdecarboxilazei în creier și mai ales în ficat și a crescut aproape dublu concentrația acidului piruvic în sînge și urină. Suplimentarea făinurilor albe de extracție 0—50% și 0—10% cu vitamina B_1 a prevenit atît scăderea tiaminuriei decarboxilazei piruvice, cît și creșterea piruvemiei, ceea ce arată că tulburările au fost cauzate de sărăcirea făinii în această vitamină.

Ținînd seama pe de o parte de repercuția procedeului de măciniș asupra conținutului în vitamină B_1 al făinii de grîu și pe de altă parte că evaluarea ca sursă de tiamină s-a făcut numai prin determinarea acesteia pe cale fizico-chimică [1], ne-am propus să studiem capacitatea făinurilor de diferite grade de extracție de a satisface nevoile de tiamină ale organismului urmărind unii indicatori biochimici utilizați ca test ai stării de nutriție tiaminică.

Încă din 1936 Peters a arătat că simptomele de deficiență tiaminică sînt legate de incapacitatea organismului de a metaboliza glucidele din dietă [2], iar Lohman și Schuster au demonstrat că forma activă a tiaminei este tiaminpirofosfatul sau cocarboxilaza, cu rol esențial în decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor, în special acidul piruvic și α-cetoglutaric [3]. În lipsa tiaminei datorită reducerii activității enzimelor dependente de tiaminpirofosfat, scade utilizarea piruvatului pe calea acizilor tricarboxilici și în consecință se reduce materialul energetic de care organismul are nevoie [4]. Avitaminoza atinge în primul rînd țesuturile care cer o respirație celulară mai mare, ca : celulele nervoase, fibrele musculare și mai ales miocardul [5].

Creșterea concentrației de acid piruvic în sîngele și în urina animalelor carențate se produce datorită scăderii activității enzimei necesare pentru decarboxilarea oxidativă a piruvatului, ceea ce constituie principalul defect metabolic în deficiența de vitamină B_1 [6], [7], [8].

Pornind de la acest fapt, în cercetarea noastră aprecierea aportului de vitamină B_1 din făinuri s-a făcut atît direct prin determinarea tiaminuriei și activității unei enzime dependente de tiamină-piruvatdecarbo-

xilaza — în ficat şi în creier, cît şi indirect prin dozarea acidului piruvic în sînge şi urină.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările s-au efectuat prin comparaţie în două serii de experienţe pe 141 şobolani (tulpina Wistar) masculi, adulţi, tineri în greutate de 160—180 g.

În seria I, 90 de animale divizate în 6 loturi egale, au fost alimentate cu făinuri de extracţie diferită (cu făină integrală şi 0—85% cîte un lot, iar de 0—50% şi 0—10% cîte 2 loturi) suplimentate cu trofinele inexistente în grîu (vitaminele A şi D prin *oleum jecoris*). Întrucît conţinutul în proteine al făinurilor variază cu gradul de extracţie şi spre a ne convinge că eventualele simptome biochimice de carenţă tiaminică sînt specifice, făinurile de extracţie mică (0—50% şi 0—10%) au fost făcute izoproteice cu cea integrală prin încorporare de gluten. La cîte unul din loturile care au primit făină de extracţie mică conţinutul lor în tiamină a fost ridicat la nivelul celui existent în bobul de grîu.

În seria a II-a, 51 de animale divizate în 3 loturi egale au fost hrănite unul cu făină integrală şi celelalte două cu făină albă de extracţie 0—10% ne- şi suplimentate cu vitamina B_1.

Hrana a fost administrată prin procedeul „pair feeding" timp de 2 luni, iar apa „ad libitum". După 2—3 săptămîni de hrănire cu făinuri de extracţie diferită, animalele au fost introduse timp de 2—4 zile în cuşti de metabolism pentru recoltarea urinei din 24 de ore, iar la finele perioadei au fost sacrificate, recoltîndu-se sîngele, ficatul şi creierul.

Tiamina în urină s-a dozat după metoda fluorometrică, sub formă de tiocrom [9], acidul piruvic în sînge şi urină, spectrofotometric după procedeul lui Friedmann şi Haugen [10], iar activitatea piruvatdecarboxilazei în omogenate de ficat şi creier, printr-o metodă spectrofotometrică imaginată de Haugen şi reprodusă de Wood [11]. Aceasta se bazează pe determinarea ferocianurii produse în procesul de decarboxilare oxidativă a piruvatului, din fericianură — ca acceptor de electroni, rezultatele fiind exprimate în unităţi/g de ţesut proaspăt/oră (o unitate este cantitatea de enzimă necesară pentru a produce 2 micromoli de ferocianură/oră, în condiţiile acestei metode).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele individuale s-au calculat valorile medii cu eroarea lor standard pentru fiecare indicator şi lot (variantă dietetică) în parte. Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabela 1.

Din datele consemnate în tabelă rezultă că tiaminuria medie a lotului hrănit cu făină de 0—85% extracţie nu s-a deosebit semnificativ de aceea a lotului hrănit cu făină integrală, dar la o micşorare mai înaintată a

Tabela 1

Starea de nutriție tiaminică a șobolanilor adulți, tineri, alimentați cu făinuri de extracție diferită

Lot nr.	Felul făinii	Tiaminuria µg/24 ore	Decarboxilaza piruvică Unit/g/oră		Acid piruvic	
			ficat	creier	sînge mg/100 ml	urină mg/24 ore
I	Integrală	12,61± 1,09	26,77± 1,16	8,66± 0,44	1,74± 0,08	0,57± 0,04
II	0–85%	10,07± 0,81	—	—	1,75± 0,10	0,59± 0,04
III	0–50%	8,15± 1,00	—	—	2,62± 0,30	0,90± 0,09
IV	0–50%+ 0,3mg B_1%	10,60± 1,12	—	—	1,39± 0,16	0,64± 0,07
V	0–10%	5,03± 0,60	17,03± 0,87	7,89± 0,40	2,47± 0,13	0,83± 0,08
VI	0–10% +0,5 mg B_1%	10,50± 1,80	26,36± 1,27	7,91± 0,36	1,81± 0,10	0,48± 0,03

Semnificația diferențelor

între	I și II	N	—	—	N	N
,,	I ,, III	$p<0,02$	—	—	$p< 0,01$	$p < 0,003$
,,	I ,, IV	N	—	—	N	N
,,	I ,, V	$p < 0,001$	$p < 0,001$	N	$p < 0,001$	$p < 0,01$
,,	II ,, VI	N	N	N	N	N
,,	II ,, III	N	—	—	$p < 0,01$	$p < 0,03$
,,	II ,, IV	N	—	—	N	N
,,	II ,, V	$p < 0,001$	—	—	$p < 0,001$	$p < 0,01$
,,	II ,, VI	N	—	—	N	N
,,	III ,, V	N	—	—	$p < 0,01$	$p < 0,02$
,,	III ,, IV	$p < 0,003$	—	—	N	N
,,	III ,, V	N	—	—	$p < 0,01$	$p < 0,001$
,,	IV ,, V	$p < 0,001$	—	—	$p < 0,01$	$p < 0,06$
,,	IV ,, VI	N	—	—	$p < 0,05$	$p < 0,05$
,,	V ,, VI	$p < 0,001$	$p < 0,001$	N	$p < 0,001$	$p < 0,001$

gradului de extracţie, eliminarea de vitamină B_1 prin urină scade cu atît mai mult, cu cît făinurile respective sînt mai albe, ajungînd ca la lotul V hrănit cu făină de extracţie 0—10%, ea să fie cu 60% mai redusă decît cea obşervată la lotul hrănit cu făină integrală.

Încorporarea de vitamină B_1 la făina de extracţie foarte joasă (10%) a ridicat valoarea tiaminuriei la nivelul celei găsite în lotul care a primit dietă cu făină de extracţie mare, ceea ce dovedeşte că diferenţele s-au datorat insuficienţei acestei vitamine.

Pe de altă parte, paralel cu scăderea tiaminuriei la loturile hrănite cu făinuri albe (0—50% şi 0—10% extracţie) se constată o creştere semnificativă a piruvemiei şi piruvuriei. Încorporarea de vitamină B_1 la aceste făinuri readuce însă piruvemia şi piruvuria la nivelul valorilor înregistrate la loturile hrănite cu făină integrală sau cu făină de 0—85% extracţie.

Activitatea piruvatdecarboxilazei din ficatul animalelor hrănite cu făină albă de extracţia 10% a fost cu 37% mai redusă decît la cele hrănite cu făină integrală, ceea ce arată că creşterea concentraţiei acidului piruvic în sînge şi eliminarea lui în urină au fost efectul reducerii activităţii decarboxilazei piruvice cauzată de insuficienţa aportului de vitamină B_1.

În contrast cu ficatul, unde capacitatea de decarboxilare a piruvatului a suferit o scădere accentuată de 37%, în creier acest sistem enzimatic a fost puţin afectat (scăderea fiind numai de 9%), deşi au apărut manifestări clinice (spasme şi convulsii) caracteristice carenţei de vitamină B_1. Acest fapt sugerează că în creier tiaminpirofosfatul este mai strîns legat în mitocondrii la organismele deficiente sau că vitamina este deplasată din organele unde se află în cantitate mai mare — ficat şi rinichi.

Deficienţa oxidării alfacetoacizilor apărînd evidentă abia în stadiul clinic al carenţei, cînd se întîlnesc semne nespecifice, ca apariţia anorexiei, pierderea greutăţii, creşterea excitabilităţii etc., are mai mult valoare de precizare a etiologiei tulburărilor decît de diagnostic precoce al deficienţei.

CONCLUZII

Micşorarea gradului de extracţie al făinii de grîu (50% şi mai jos) scade considerabil aportul de tiamină necesar metabolizării normale a glucidelor furnizate şi, ţinînd seama de faptul că derivatele de cereale alcătuiesc principala sursă de glucide, riscul unui aport neadecvat apare evident pentru om. Determinarea activităţii unei enzime al cărei coferment este reprezentat de vitamina B_1, sub forma sa activă de tiaminpirofosfat, cît şi a unui produs intermediar al metabolismului glucidic, permite detectarea unui dezechilibru tiamino-glucidic şi, pe de altă parte, serveşte împreună cu alţi indicatori atît la stabilirea nevoii de tiamină, cît şi la controlul biochimic al stării de nutriţie cu această vitamină.

Prezentat la redacţie la 7 iunie 1971

Catedra de igiena alimentaţiei
I. M. F., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. C. R. Jones, J. R. Fraser, T. Moran, Cereal. chem., **37**, 9, (1960).
2. R. A. Peters, Biochem. J., **30**, 2206 (1936).
3. K. Lohman, Ph. Schuster, Naturwissenschaft., **25**, 26 (1937).
4. D. W. McCandless, S. Schenker, M. Cook, J. clin. Invest.,**47**, 2268 (1968).
5. D. W. McCandless, C. Hanson, K. V. Speeg, S. Schenker, J. Nutr., **100**, 991 (1970).
6. C. J. Gubler, J. Biol. Chem., **236**, 3112 (1961).
7. R. E. Koeppe, R. M. O'Neal, C. H. Hahn, J. Neurochem., **11**, 695 (1964).
8. R. M. Buckle, Proc. R. Soc. Med., **60**, 48 (1967).
9. H. M. Haugen, Scand. J. Clin. Lab. Invest., **12**, 384 (1960).
10. T. E. Friedemann, G. E. Haugen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
11. S. P. Calowick, N. O. Kaplan, *Methods in enzymology*, IX, Academic Press, New York-Londra, 1966, p. 258.

RELATION BETWEEN PYRUVIC ACID IN BLOOD AND URINE AND PYRUVATE DECARBOXYLASE IN THE LIVER AND BRAIN IN RATS FED WITH VARIOUS FLOURS

SUMMARY

Rats (141) were fed with various flours. Parallel to the diminution of the extraction degree, B_1 vitamin amount in urine decreased by about 2.5 times in rats fed with 0—10% white flour in comparison with those fed with whole flour ; also, the pyruvate decarboxylase activity diminished in brain and especially in liver and the concentration of the pyruvic acid in blood and urine almost doubled.

Addition of vitamin B_1, to 0—50% and 0—10% white flours prevented the decrease of B_1 vitamin amount in urine and of pyruvate decarboxylase as much as the increase in pyruvic acid in blood which shows that the troubles were caused by the lack of vitamin B_1 in flour.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 79–86 (1972)

EFECTUL ATP-ULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII LACTAT DEHIDROGENAZEI ȘI IZOENZIMELOR SALE ÎN CURSUL MULTIPLICĂRII VIRUSULUI HERPETIC

E. PRAHOVEANU, M. ȘERBAN, R. LUPU ȘI M. GRUIA

Rezumat. — Virusul herpetic tulpina „Troscot" determină o creștere a activității LDH la nivelul membranelor corioalantoidiene din ouăle embrionate, inoculate cu acest virus. Prezența ATP-ului induce o stimulare marcantă a activității enzimatice, care atinge valori maxime la 48 de ore, și, respectiv, după 72 de ore de la inocularea virusului. Datele obținute sugerează o corelație între efectul ATP, activarea proceselor glicolitice și multiplicarea virusului herpetic.

Problema surselor de energie necesară proceselor de sinteză și multiplicare a virusurilor a atras de mult atenția cercetătorilor [1], [2], [3], [5], [6], constituind una din preocupările majore din acest domeniu.

Încă din 1948 s-a emis ipoteza că sursa de energie pentru multiplicarea virusurilor o pot constitui legăturile macroergice polifosforice din celula atacată de virus [20]. S-a admis, totodată, posibilitatea acumulării și transmiterii energiei din componentele fosfoorganice ale structurilor nucleoproteidelor virale, de exemplu trecerea energiei pe acceptori speciali de tipul acidului nucleic și folosirea ei în procesele de sinteză virală [1], [19].

O serie de cercetări [1]—[6] menționează, de asemenea, faptul că multiplicarea virusului depinde de prezența unui stocaj adecvat de energie în celula gazdă.

Mai recent, investigarea aspectului metabolic al relației virus-celulă gazdă este abordată prin urmărirea modificărilor în viteza respiratorie a organismelor infectate și, respectiv, prin cercetarea activității unor enzime ale gazdei în procesul de multiplicare a virusului [6]—[11], [18].

În cercetări anterioare [11], [18] referitoare la relațiile celulă gazdă-virusuri ARN, am arătat că pătrunderea virusurilor în organism și sinteza lor în anumite celule produce o serie de modificări biochimice, printre care și variații ale nivelului lactat dehidrogenazei (LDH) și ale izoenzimelor sale.

În continuarea acestor cercetări și pe baza premiselor stabilite anterior ne-am propus să urmărim comportarea activității LDH (E.C. 1.1.1.27), precum și a izoenzimelor respective din membrana corioalantoidiană (mca) și din lichidul alantoidian al ouălor embrionate, inoculate cu un virus de tip ADN (virus herpetic, tulpina „Troscot").

În cadrul acestor cercetări ne-am propus să urmărim, totodată, efectul pe care l-ar putea manifesta adenozintrifosfatul (ATP), ca sursă de energie, asupra multiplicării acestui virus și, respectiv, asupra activității LDH, enzimă implicată în catena glicolitică, furnizoare de energie.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe ouă embrionate de găină (rasa Leghorn), în vîrstă de 10 zile, inoculate pe membrana corioalantoidiană cu 0,1 ml suspensie de membrană corioalantoidiană infectată cu virus herpetic, tulpina „Troscot" (diluţie 1/10). Această tulpină a fost menţinută 13 pasaje pe mca a ouălor embrionate. Ouăle de referinţă au fost inoculate, în aceleaşi condiţii, cu 0,1 ml soluţie 0,145 M de clorură de sodiu. Anterior inoculării virusului s-a injectat 0,1 ml dintr-o soluţie de ATP de concentraţie 10 μg/0,1 ml, o aceeaşi soluţie fiind introdusă şi în ouăle embrionate, neinfectate, care au servit ca lot martor.

Incubarea s-a realizat la +35°C. La intervale de timp de 8, 12, 20, 24, 48, 72, 96 şi respectiv 120 de ore, incubarea a fost întreruptă, iar ouăle (cîte 5 inoculate cu virus şi cîte 5 din cele normale, cu şi fără adaos de ATP) au fost menţinute la +4°C, timp de 24 de ore, pînă la recoltarea lichidului alantoidian şi a membranelor corioalantoidiene.

Lichidul alantoidian şi supernatantul suspensiei membranelor au servit pentru determinarea activităţii LDH şi evidenţierea spectrului electroforetic al izoenzimelor respective.

Activitatea enzimatică a LDH din lichidul alantoidian a fost determinată spectrofotometric, după tehnica descrisă într-o lucrare precedentă [11], iar cea din membrana corioalantoidiană, după metoda Scarfe şi Alexander [15].

Analiza electroforetică pentru punerea în evidenţă a izoenzimelor LDH din lichidul alantoidian şi din membrane s-a realizat, de asemenea, în condiţiile descrise anterior [11], [18]. Cantitatea de proteină supusă electroforezei în gel de amidon a fost identică (100 γ) pentru toate probele, atît cele provenind din lichidul alantoidian cît şi cele din membranele corioalantoidiene.

O parte din extractul membranelor recoltate a fost folosit pentru urmărirea dinamicii infectivităţii pe culturi tisulare de embrion uman. Aceste teste s-au efectuat pe membrana corioalantoidiană, la intervalele de timp menţionate mai sus.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele experimentale obţinute rezultă că inocularea ouălor embrionate cu virus herpetic determină o serie de modificări ale activităţii totale a LDH. Influenţa pe care procesul de multiplicare virală o exercită asupra acestei enzime se manifestă atît la nivelul membranei corioalantoidiene (mca), cît şi la nivelul lichidului alantoidian.

În tabela 1 şi, respectiv, în figura 1 este prezentată dinamica activităţii LDH din mca infectate cu virus, în prezenţa şi în absenţa ATP-ului.

Se poate constata, în primul rînd, că virusul herpetic ca atare, în absenţa ATP, determină, în comparaţie cu lotul de referinţă, o uşoară creştere a activităţii enzimatice în primele 24 de ore. Efectul virusului,

Tabela 1

Activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) şi titrul virusului herpetic, tulpina „Troscot" în extractul de membrană corioalantoidiană infectată şi normală *

Ore după inoculare	Activitatea LDH (u/mg proteină) în membrana corioalantoidiană				Titrul virusului herpetic (log)			
	virus +ATP	virus − ATP	martor + ATP	martor − ATP	virus +ATP	virus −ATP	martor +ATP	martor −ATP
8	220±14,2	106±8,4	120±21,0	80±13,0	10^{-1}	10^{-1}	0	0
12	216±19,8	106±7,6	120±14,1	89± 9,0	10^{-2}	10^{-1}	0	0
20	212±19,8	104±8,0	117±17,0	71±15,1	$10^{-2,5}$	10^{-1}	0	0
24	208±15,0	104±5,9	132±14,1	84± 8,3	$10^{-3,5}$	$10^{-2,5}$	0	0
48	312±25,5	170±14,2	122±19,1	82± 4,5	10^{-4}	10^{-3}	0	0
72	268±33,0	148±14,2	122±20,0	91±12,2	10^{-4}	$10^{-2,6}$	0	0
96	344±28,5	172±20,0	149±20,0	104± 6,7	10^{-5}	$10^{-4,5}$	0	0
120	484±56,7	201±15,8	181±26,8	111±13,0	10^{-5}	10^{-5}	0	0

* Cifrele reprezintă media a cinci determinări.

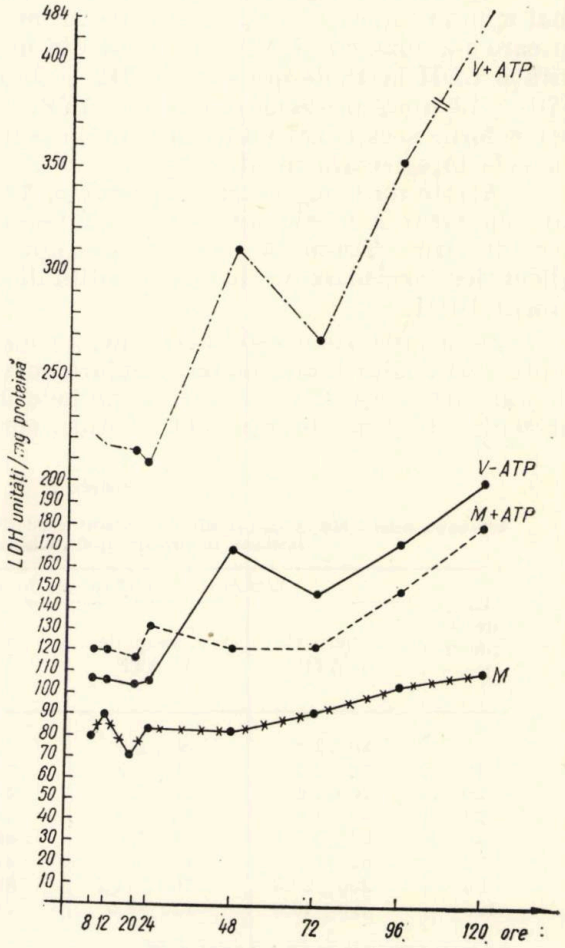


Fig. 1. — Activitatea LDH din extractul de membrană corioalantoidiană a ouălor embrionate neinoculate (M) şi inoculate cu virus herpetic (V) în prezenţa şi absenţa ATP.

reflectat prin procesul de multiplicare, devine însă mai evident între 24 şi 120 de ore, cînd se înregistrează o creştere marcantă a activităţii enzimatice.

În al doilea rînd se constată că prezenţa ATP exercită o acţiune stimulantă asupra creşterii activităţii LDH din mca, în raport cu probele infectate, la care ATP a fost absent (fig. 1).

Se observă din curba activităţii enzimatice o primă creştere între 24 şi 48 de ore şi o a doua creştere între 72 şi 120 de ore, în intervalul de 48 şi 72 de ore înregistrîndu-se o oarecare tendinţă de scădere a acestei activităţi. Deşi valorile medii ale activităţii enzimatice sînt evident mai crescute în mca infectate cu virus în prezenţa ATP, totuşi o aceeaşi evoluţie bifazică a fenomenului se constată şi în cazul activităţii enzimatice din mca infectate cu virus, dar în absenţa ATP, cu un maxim la 48 de ore (fig. 1).

Cu toate că, în comparaţie cu lotul martor, există creşteri ale activităţii enzimatice şi în mca provenite de la ouă embrionate inoculate numai cu virus herpetic, fără adaos de ATP, totuşi aceste creşteri prezintă valori mai mici în raport cu cele constatate la mca ale ouălor inoculate cu virus la care s-a adăugat şi ATP. În acest din urmă caz, valoarea medie a activităţii LDH la 48 de ore este de 312 $\pm$ 25 u/mg proteină, faţă de numai 170 $\pm$ 14 u/mg proteină în absenţa ATP, pentru ca începînd de la 72 de ore valorile acestei activităţi să se dubleze în prezenţa ATP, în comparaţie cu cele înregistrate în absenţa sa.

Aceste date sugerează că prezenţa ATP în ouăle embrionate inoculate cu virus herpetic influenţează favorabil procesul de multiplicare a acestui virus. Totodată se poate presupune şi o stimulare a proceselor glicolitice furnizoare de energie, însoţită de o creştere semnificativă a activităţii LDH.

Modificări ale acestei activităţi au fost detectate şi în lichidul alantoidian al ouălor embrionate inoculate cu virus herpetic. Şi în acest sens se constată creşteri în raport cu probele de referinţă (tabela 2), atît în prezenţa cît şi în absenţa ATP. Totuşi, spre deosebire de valorile activi-

Tabela 2

Activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) în lichidul alantoidian al ouălor embrionate normale şi inoculate cu virusul herpetic, tulpina „Troscot" *

Ore după inoculare	Activitatea LDH (u/ml) în lichidul alantoidian			
	v. herpetic + ATP	v. herpetic − ATP	martor + ATP	martor −ATP
8	80±2,8	40±2,8	49±7,6	31±3,7
12	72±2,3	48±4,2	39±5,9	25±2,0
20	76±4,2	56±5,7	46±5,0	21±2,3
24	80±9,8	64±5,6	48±6,3	26±3,1
48	64±5,6	81±7,1	48±5,8	30±4,8
72	64±4,8	65±5,6	44±4,8	27,5±3,1
96	286±25,5	169±11,5	38±3,0	24±2,8
120	420±49,0	110±8,5	50±66,0	22±1,7

* Cifrele reprezintă media a 5 determinări.

tăţii enzimatice constatate la nivelul mca, cele din lichidul alantoidian sînt, în prezenţa ATP, destul de apropiate în intervalul 8—48 de ore. Abia după 72 de ore se produce o creştere bruscă a activităţii enzimatice, re-

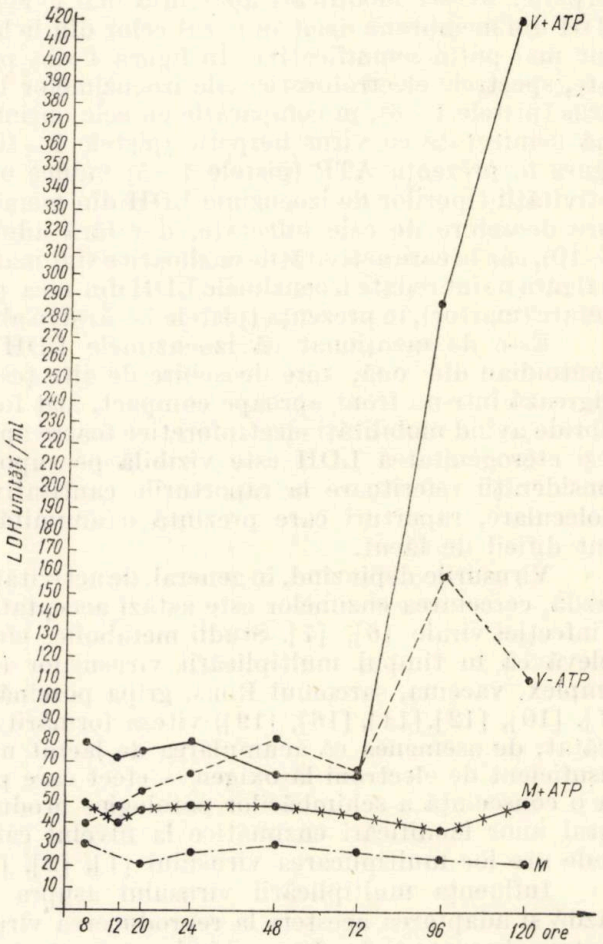


Fig. 2. — Activitatea LDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate neinoculate (M) şi inoculate cu virus herpetic (V) în prezenţa şi absenţa ATP.

marcîndu-se valori deosebit de crescute ale acestei activităţi la 96 şi respectiv 120 de ore, în comparaţie cu cele din lichidul alantoidian al ouălor embrionate şi infectate, la care însă nu s-a administrat ATP (fig. 2).

Datele obţinute reflectă deci un anumit efect exercitat de către ATP asupra multiplicării virusului, ca şi o intensificare a proceselor metabolice, corelată cu această multiplicare (fig. 3).

S-a observat apariţia primelor colonii la 72 de ore de la inoculare, colonii localizate, cu aspect rotund, prezentîndu-se în grupuri limitate ca număr ; în a 4—5-a zi numărul creşte şi cuprinde toată suprafaţa membranei.

Prezenţa ATP determină o ridicare a potenţialului de multiplicare a virusului, fapt dovedit şi printr-o creştere a titrului virusului, de 10 ori

la 48 de ore şi respectiv de 14 ori la 72 de ore, comparativ cu titrul virusului * inoculat în mca, dar în absenţa ATP (tabela 1).

Anumite modificări cantitative se observă şi la nivelul izoenzimelor LDH din mca, ca şi al celor din lichidul alantoidian, sub acţiunea virusului herpetic. Aceste modificări apar însă mai evidente în cazul izoenzimelor LDH din membrane decît în cazul celor din lichdul alantoidian, unde ele sînt mai puţin semnificative. În figura 4 sînt prezentate, spre exemplificare, spectrele electroforetice ale izoenzimelor LDH din mca infectate cu virus (pistele 1—6), în comparaţie cu cele obţinute din mca provenite din ouă neinfectate cu virus herpetic (pistele 7—10). După cum rezultă din figura 5, prezenţa ATP (pistele 1—5) induce o oarecare intensificare a activităţii tipurilor de izoenzime LDH din membranele infectate cu virus, spre deosebire de cele infectate, dar fără adminstrare de ATP (pistele 6—10), caz în care activităţile enzimatice sînt mai slabe. Pentru comparaţie, în figura 6 sînt redate izoenzimele LDH din mca provenite de la ouă neinfectate (martor), în prezenţa (pistele 1—5) şi în absenţa ATP (pistele 6—10).

Este de menţionat că izoenzimele LDH din mca şi din lichidul alantoidian din ouă, spre deosebire de alte ţesuturi sau fluide biologice, migrează într-un front aproape compact, atît formele parentale cît şi cele hibride avînd mobilităţi electroforetice foarte apropiate. Din acest motiv, deşi eterogenitatea LDH este vizibilă pe suportul de migrare, anumite consideraţii referitoare la raporturile cantitative dintre diferitele forme moleculare, raporturi care prezintă o anumită semnificaţie biochimică, sînt dificil de făcut.

Virusurile depinzînd, în general, de activităţile biocatalitice ale celulei gazdă, cercetarea enzimelor este astăzi acceptată ca mijloc de investigare a infecţiei virale [6], [7]. Studii metabolice efectuate asupra membranei relevă că în timpul multiplicării virusurilor (mixoma, fibroma, herpes simplex, vaccina, sarcomul Rous, gripa porcină, virusul Newcastle [4]—[7], [10], [12], [14], [16], [19]) viteza formării acidului lactic creşte. S-a arătat, de asemenea că acumularea de lactat nu s-ar datora transferului insuficient de electroni la oxigen — efect care poate fi presupus că apare ca o consecinţă a schimbărilor patologice produse de virus, ci este rezultatul unor modificări enzimatice la nivelul catenei glicolitice, în celula unde are loc multiplicarea virusului [1], [2], [11], [12], [18].

Influenţa multiplicării virusului asupra metabolismului ţesutului gazdă şi adaptarea acesteia la reproducerea virusurilor a fost unul din aspectele abordate şi de către noi în lucrări anterioare [11], [18]. Cu această ocazie am subliniat semnificaţia intensificării metabolismului anaerob sub acţiunea virusului gripal, a cărui multiplicare este condiţionată şi de energia provenită din procesele de tip glicolitic.

În acest context, din datele prezentate în această lucrare reiese că mca răspunde la infecţia cu virus herpetic printr-o creştere marcată a activităţii lactat dehidrogenazei. O creştere în viteza metabolizării glucozei la piruvat s-ar repercuta şi asupra vitezei formării de ATP, care ar putea să participe la procesele biochimice din timpul sintezei virusului, recunoscut fiind faptul că energia mare a polifosfaţilor joacă un rol esenţial în metabolismul carbohidraţilor. Modificarea activităţii LDH, con-

* Titrul virusului a fost determinat după formula lui Reed şi Munch (Ann. J. Hyg., 27, 493 (1938)).

statată în prezența ATP-ului, în condițiile infecției cu virus herpetic, sugerează rolul acestui compus macroergic în stimularea anumitor procese biochimice implicate în infecția virală.

Compararea datelor obținute evidențiază, astfel, existența unei corelații între efectul ATP-ului, activarea proceselor glicolitice și multiplicarea virusului herpetic. Desigur, aceste date reprezintă numai un aspect din ansamblul corelațiilor biochimice virus-celulă gazdă [1], [12], [13], [14], [17], [18], [21].

CONCLUZII

— Virusul herpetic determină o creștere a activității enzimatice LDH la nivelul membranelor corioalantoidiene ale ouălor embrionate și, într-o mai mică măsură, la nivelul lichidului alantoidian.

— Prezența ATP-ului induce o stimulare marcantă a activității LDH, în special la nivelul membranelor corioalantoidiene, atingînd valori maxime la 48 de ore și respectiv după 72 de ore de la inocularea virusului.

— Modificările constatate în dinamica activității LDH se reflectă, într-o anumită măsură, și la nivelul izoenzimelor LDH din membranele corioalantoidiene inoculate cu virus herpetic, în prezența și în absența ATP.

— Datele obținute evidențiază o corelație între efectul ATP, activarea proceselor glicolitice și multiplicarea virusului herpetic.

Prezentat la redacție la 22 octombrie 1971

Institutul de virusologie
„Ștefan S. Nicolau"
și
Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1 Ackermann, W., J. Biol. Chem., **189**, 421 (1951).
2. Ackermann W., J. exp. Med., **93**, 635 (1951).
3. Ackermann W., J. exp. Med., **97**, 315 (1953).
4. Becker J., Grossowicz, V., Bernkopf H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **97**, 77 (1958).
5. Eaton D. M., Arch. ges. Virusforsch., **5**, 53 (1952).
6. Gilbert V. E., Virology, **21**, 609 (1963).
7. Kolter S., Enster A. K., Arch. ges. Virusforsch., **20**, 180 (1970).
8. Mayerhof O., Geliozkova N., Arch. Biochem., **12**, 405 (1947).
9. Milled A., Scott, J. K., Ann. Rev. plant. physiol., **13**, 539 (1962).
10. Novazio F., Ernster B. B., Ernster L., Biochim., Biophys. Acta **26**, 416 (1957).
11. Prahoveanu E., Șerban M., Moisa I., St. cerc. biochim., **13**, 313 (1970).
12. Rafelson M. E., Winzler R. T., Peterson H. E., J. Biol. Chem., **181**, 583 (1949).
13. Roizman B., Borman G. S., Kamali-Rousta M., Nature, **206**, 1374 (1965).
14. Ross L. J. N., Watson D. H., Wildy P., J. gen. Virol., **2**, 115 (1968).
15. Scarfe J. F., Alexander E., Rad. Res., **15**, 658 (1961).
16. Siegel B. V., Batts A. H., Arch. ges. Virusforsch., **7**, 498 (1957).
17. Spear P. G., Roizman B., Virology, **36**, 545 (1968).
18. Șerban M., Prahoveanu E., St. cerc. biochim., **13**, 79 (1970).
19. Tien P., Tang P. S., Acta Virologica, **7**, 368 (1963).
20. Tovarnischi W. I., Lucrările Academiei de Științe a U.R.S.S., 1948, p. 156.
21. Wieme R. J., Postgrad. Med., **35**, A—38 (1964).

THE ATP EFFECT UPON LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND ISOENZYMES IN THE COURSE OF HERPETIC VIRUS MULTIPLICATION

SUMMARY

Herpetic virus "Troscot" strain determines an increase of the LDH activity at the corioalantoidian membranes level from embryonate eggs, inoculated with this virus. The presence of ATP induces a marked stimulation of enzymic activity which touches maximal values at 48, respectively after 72 hours from the virus inoculation. Obtained data suggest some correlation beetween ATP effect, glicolytic processes activation and herpetic virus multiplication.

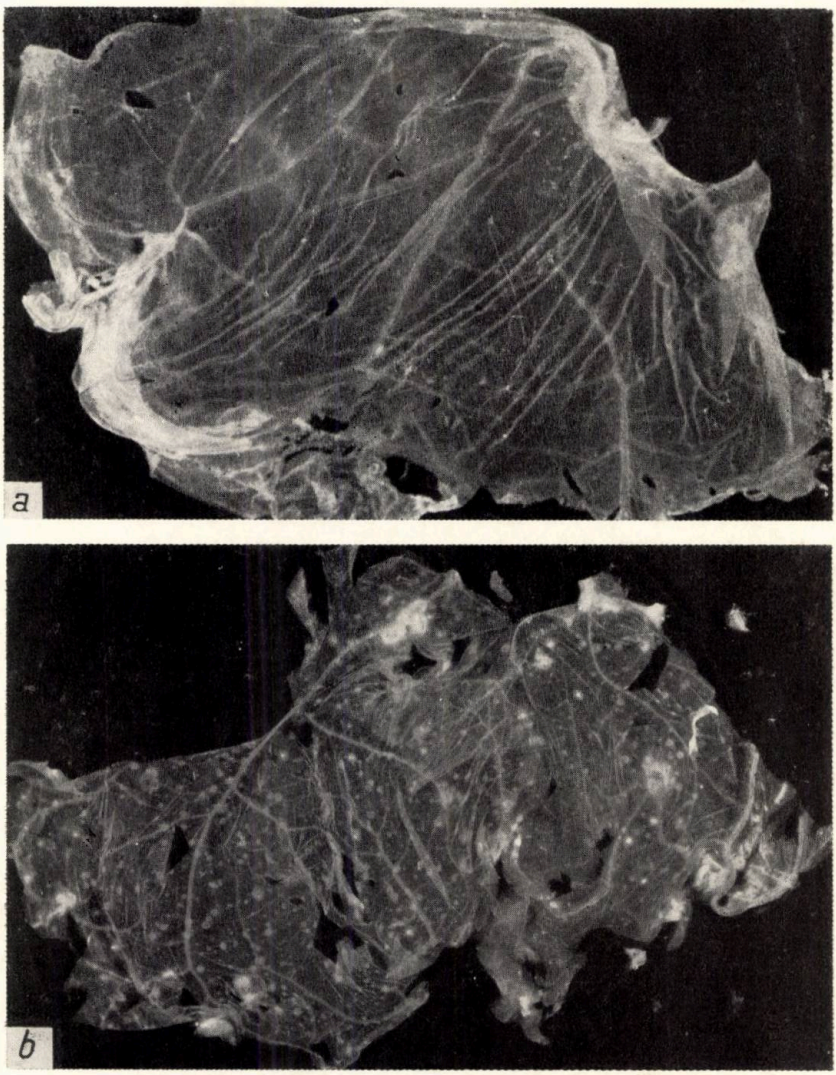


Fig. 3. — Membrană corioalantoidiană normală (*a*) și inoculată cu virus herpetic, tulpina „Troscot" (*b*).

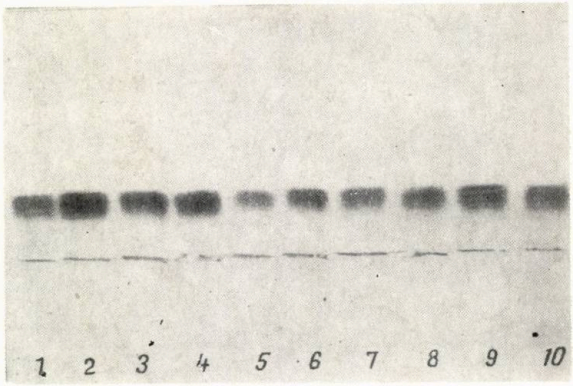


Fig. 4. — Izoenzimele LDH din membranele corioalantoidiene provenite de la ouă embrionate, inoculate cu virus herpetic (1—6) (după 12, 20, 24, 48,72, 96 ore) și neinoculate (7—10) (după 24, 48, 72, 96 ore).

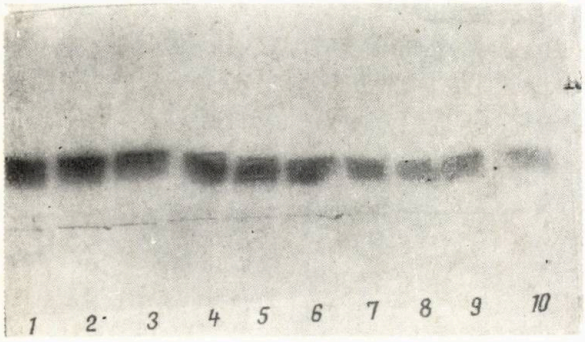


Fig. 5. — Izoenzimele LDH din membranele corioalantoidiene provenite de la ouă embrionate, inoculate cu virus herpetic în prezența ATP (1—5) și absența (6—10) ATP (după 4, 8, 12, 20 și 24 ore de la inoculare).

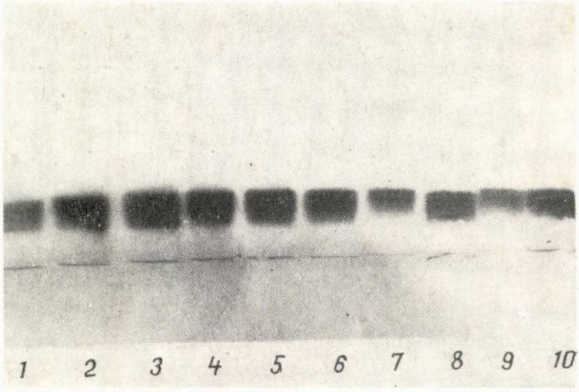


Fig. 6. — Izoenzimele LDH din membranele corioalantoidiene provenite de la ouă embrionate normale (neinoculate cu virus herpetic) în prezența (1—5) și absența (6—10) ATP (după 12, 20, 24, 48 și 72 ore).

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 87–92 (1972)

ACTIVITATEA L-ASPARAGINAZICĂ ÎN SUCURILE OBȚINUTE DIN FRUNZE DE PORUMB ȘI GRÎU TRATATE PRIN VACUUM-INFILTRAȚIE CU INHIBITORI METABOLICI

MARIA RABEGA

Rezumat. — S-a cercetat activitatea **L-asparaginazică** în sucurile stoarse din frunzele plantulelor de porumb și de grîu, care au fost infiltrate prin vacuum cu soluții de inhibitori metabolici. S-a constatat că atît sucurile vacuolare, cît și cele plasmatice prezintă activitate asparaginazică, ceea ce demonstrează prezența asparaginazei atît în biostructură, cît și în materia din afara ei. Sub acțiunea dinitrofenolului, diclorfenolului, dinitronaftolului și a azidei de sodiu o parte din asparaginaza cuprinsă în biostructură este eliberată.

Numeroasele lucrări publicate cu privire la L-asparaginază (L-asparagin-amidohidrolaza, E.C. 3.5.1.1.) au studiat aspecte legate de specificitatea enzimatică [1], de cinetică [2], [3], de purificare [4], de inhibiția L-asparaginazei prin carbobenzoxi-L-fenilalanină și N-carbobenzoxi-S-benzil-L-cisteină [5], de polimorfismul L-asparaginazei de origini diferite [6], de distribuția activității asparaginazei în leguminoase [7] etc.

Studii cu privire la activitatea asparaginazei în sucurile vacuolare și plasmatice obținute din frunze de porumb și grîu, infiltrate prin vacuum cu soluții de inhibitori metabolici, nu s-au efectuat pînă acum.

În lucrarea de față ne-am propus să stabilim care anume este localizarea L-asparaginazei în țesutul foliar de porumb și grîu și, îndeosebi, să precizăm dacă această enzimă este sau nu integrată în biostructura frunzelor respective.

În acest scop am determinat, pe de o parte, activitatea L-asparaginazică în sucul vacuolar obținut prin stoarcerea frunzelor de porumb și grîu tratate cu inhibitori metabolici, față de aceea din sucul vacuolar obținut din frunze netratate. Pe de altă parte, am determinat și activitatea asparaginazică a sucului plasmatic stors după omorîrea reziduurilor rămase în presă în urma îndepărtării sucului vacuolar, atît din frunzele tratate cu inhibitori metabolici, cît și din frunzele martor, netratate.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările experimentale s-au făcut pe frunze de plantule de porumb (HS 301) și frunze de plantule de grîu (Triumph), după 14–16 zile de creștere în condiții de seră. Ca inhibitori metabolci am folosit

soluţii de 2,4-dinitrofenol, 2,4-diclorfenol de concentraţie 10^{-3} M, 2,4-dinitronaftol de concentraţie 10^{-4} M şi azidă de sodiu în concentraţie de 10^{-2} M. Soluţiile apoase de inhibitori metabolici erau introduse în frunze prin metoda vacuum-infiltraţiei [8], utilizînd pentru toate determinările o cantitate de 50 g frunze. În frunzele folosite ca martor se introducea în aceleaşi condiţii apă distilată, în locul soluţiilor apoase de inhibitori. După 30 min de infiltrare, frunzele şterse prin tamponare cu hîrtie de filtru se storceau la o presă de laborator tip Hafico, model 2 litri, la presiunea de 150 at.

Reziduurile rămase după stoarcerea frunzelor proaspete au fost omorîte folosind o atmosferă de vapori de cloroform, timp de 24 de ore. Apoi se storceau la presă în aceleaşi condiţii ca şi frunzele proaspete.

Sucurile obţinute se măsurau cu cilindrul gradat, iar după centrifugarea lor la 3000 rot/min s-a determinat activitatea asparaginazică, după metoda Meister [9], iar amoniacul l-am dozat după metoda Conway [10]. Citirile s-au făcut la spectrocolorimetrul Spekol model Carl Zeiss Jena, iar rezultatele s-au exprimat în gamma NH_3/mg proteină. Conţinutul în proteină s-a determinat după tehnica lui Miller [11].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza datelor prezentate în tabela 1 se constată că atît în cazul sucurilor obţinute din frunzele de porumb, cît şi al celor din frunze de grîu, activitatea asparaginazică raportată la 1 ml suc sau la cantitatea de suc stoarsă este crescută în sucurile obţinute de la frunzele tratate cu inhibitori, faţă de sucul martor. Aceste creşteri dovedesc că în cazul frunzelor tratate cu inhibitori metabolici, la asparaginaza existentă în sucul vacuolar se adaugă o cantiate de enzimă eliberată din biostructură. Într-adevăr, s-a demonstrat [12], [13] că inhibitorii metabolici folosiţi în doze care nu omoară ţesutul viu determină o destrămare parţială a biostructurii. Este evident că surplusul de asparaginază menţionat nu poate proveni, în cazul de faţă, decît din acea porţiune a biostructurii care s-a destrămat sub influenţa inhibitorilor menţionaţi.

Comparînd rezultatele obţinute prin tratarea frunzelor de porumb şi grîu cu soluţii de 2,4-dinitrofenol, 2,4-diclorfenol, 2,4-dinitronaftol sau azidă de sodiu se constată că valorile sînt mai mari în cazul utilizării 2,4-dinitronaftolului. Dacă se ţine seama de faptul că soluţia de 2,4-dinitronaftol este mai diluată decît cele de 2,4-dinitrofenol şi de azidă de sodiu (10^{-4} faţă de 10^{-3} respectiv 10^{-2} M), se poate afirma că 2,4-dinitronaftolul acţionează mai energic asupra biostructurii, eliberînd o cantitate mai mare de enzimă.

Acelaşi fenomen se constată şi dacă se ia în considerare cantitatea de suc vacuolar obţinută prin stoarcerea frunzelor tratate cu 2,4-dinitronaftol, faţă de cantităţile obţinute din frunzele tratate cu 2, 4-dinitrofenol sau cu 2,4-diclorfenol.

Din datele prezentate în tabela 2 se constată că activitatea L-asparaginazică a sucurilor plasmatice obţinute atît din reziduurile omorîte,

Tabela 1

Volumul (ml) și activitatea L-asparaginazei (gamma NH_3/mg proteină) a sucurilor obținute prin stoarcerea la 150 at a probelor de cîte 50g frunze proaspete atît de porumb, cît și de grîu infiltrate prin vacuum cu soluții de 2,4-dinitrofenol (DNP), 2-4-diclorfenol (DCP) de conc. 10^{-3} M, 2, 4-dinitronaftol (DNN) de conc. 10^{-4} M, azidă de sodiu (NaN_3) de conc. 10^{-2} M și cu apă (martor – M)

V (ml)					Activitatea enzimatică γNH_3/mg proteină					Activitatea enzimatică la cantitatea de suc obținută				
M	DNP	DCP	DNN	NaN_3	M	DNP	DCP	DNN	NaN_3	M	DNP	DCP	DNN	NaN_3
Sucurile vacuolare din frunze de porumb														
17	30	31	34	33	1,43	1,10	1,09	1,36	1,07	24,3	33,0	33,8	46,2	35,3
17	29	30	34	32	1,47	1,16	1,07	1,41	1,12	25,0	33,6	32,1	47,9	35,8
16	29	30	33	32	1,55	1,21	1,10	1,50	1,18	24,8	35,1	33,0	49,5	37,8
15	28	29	34	33	1,39	1,13	1,03	1,32	1,15	20,9	31,6	29,9	44,9	38,0
Sucurile vacuolare din frunze de grîu														
19	33	34	37	36	1,11	1,03	0,82	1,18	0,62	20,1	34,0	27,9	43,7	22,3
19	32	35	37	35	1,22	1,06	0,78	1,26	0,50	23,2	33,9	27,3	46,6	17,5
18	32	34	38	35	1,15	1,02	0,91	1,15	0,59	20,7	32,6	30,9	43,7	20,7
19	31	34	36	34	1,28	0,98	0,80	1,28	0,70	24,3	30,4	27,2	46,1	23,8

Tabela 2

Volumul (ml) şi activitatea L-asparaginazei (gamma NH_3/mg proteină) a sucurilor obţinute din reziduurile omorîte, rămase după stoarcerea celor 50g frunze de porumb şi de grîu infiltrate prin vacuum cu soluţii de 2,4-dinitrofenol (DNP), 2,4-diclorfenol (DCP) de conc. 10^{-3} M, 2,4-dinitronaftol (DNN) de conc. 10^{-4} M, azidă de sodiu (NaN_3) de conc. 10^{-2} M şi cu apă (martor – M)

V (ml)					Activitatea enzimatică γ NH_3 /mg proteină					Activitatea enzimatică la cantitatea de suc obţinută				
M	DNP	DCP	DNN	NaN_3	M	DNP	DCP	DNN	NaN_3	M	DNP	DCP	DNN	NaN_3
Sucurile plasmatice din frunze de porumb														
23	12	12	10	9	0,84	0,75	0,64	0,82	1,10	19,3	9,0	7,7	8,2	9,9
23	13	11	9	10	0,78	0,77	0,56	0,80	0,96	17,9	10,0	6,2	7,2	9,6
22	14	11	9	10	0,72	0,72	0,58	0,76	1,15	15,8	10,1	6,4	6,8	11,5
22	14	12	10	11	0,70	0,70	0,61	0,71	0,92	15,4	9,8	7,3	7,1	10,1
Sucurile plasmatice din frunze de grîu														
25	15	16	13	14	0,61	0,51	0,48	0,54	0,46	15,3	7,7	7,7	7,0	6,4
25	15	16	13	14	0,59	0,55	0,50	0,58	0,40	14,8	8,3	8,0	7,5	5,6
24	14	15	12	13	0,53	0,48	0,42	0,49	0,44	12,7	6,7	6,4	5,9	5,7
24	15	15	12	12	0,56	0,46	0,40	0,55	0,39	13,4	6,9	6,0	6,6	4,7

rămase de la frunzele de porumb, cît şi de la cele de grîu, tratate cu inhibitori, este mai slabă faţă de cea a sucurilor plasmatice martor. Această scădere a activităţii enzimatice se datorează faptului că o dată ce tratarea frunzelor cu inhibitori a determinat o destrămare parţială a biostructurii, cu eliberare de L-asparaginază, este firesc ca în sucul plasmatic obţinut după omorîrea reziduurilor respective să se găsească mai puţină L-asparaginază decît în sucul plasmatic stors din reziduurile frunzelor martor.

De asemenea s-a mai constatat că inhibitorii metabolici, în concentraţia în care au fost folosiţi în lucrarea de faţă, nu modifică activitatea asparaginazică. Experienţele au demonstrat că sucul centrifugat, diluat în proporţie de 1 : 25 cu soluţii apoase de inhibitori metabolici în concentraţiile menţionate mai sus şi apoi prelucrat în modul arătat, a dat pentru activitatea asparaginazică practic aceleaşi valori ca şi în cazul aceluiaşi suc diluat, în aceeaşi proporţie cu apă distilată.

CONCLUZII

— În frunzele de porumb şi grîu L-asparaginaza se găseşte atît în biostructură, cît şi în partea nebiostructurată a ţesutului foliar.

— În concentraţiile în care au fost folosiţi în prezenta lucrare, inhibitorii metabolici determină o parţială destrămare a biostructurii dar nu influenţează activitatea însăşi a L-asparaginazei.

Prezentat la redacţie la 11 octombrie 1971

Universitatea Bucureşti,
Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. W. Grasmann, O. Mayr, Z. physiol. chem., **178**, 695 (1933).
2. G. Busch, Biochem. Z., **312**, 308 (1942).
3. A. P. Mistretta, G. C. Tassi, A. de Barbieri, Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., **45**, 1120 (1969).
4. T. Kristiansen, M. Einersson, L. Sundberg, J. Porath, Febs, **7**, 294 (1970).
5. G. Mor, N. Lichtenstein, Febs, **3**, 313 (1969).
6. L. M. Buruiana, M. Lerch, A. Dema, St. cerc. biochim., **13**, 225 (1970).
7. E. M. Lees, A. B. Blakeney, Biochim. Biophys. Acta, **215**, 228 (1970).
8. A. N. Belozerskii, N. I. Proskuriakov, *Praticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii*, Gosudarstvennoe izdatelstvo Sovetskaia Nauka, Moskva, 1951, p. 293.
9. P. S. Colowick, O.N. Kaplan, *Methods, in Enzymology*, vol. II, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1955, p. 383.
10. I. Alteras, N. Cajal, I. Cojocaru, S. Comoroşan, P. Dăncescu, T. Ieremia, V. Kondi, N. Mitrică, *Metodele laboratorului clinic*, Edit. medicală, Bucureşti, 1964, p.237.
11. G. L. Miller, Analyt. Chem., **31**, 964 (1959).
12. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
13. E. Macovschi, M. Rabega, St. cerc. biochim., **13**, 219 (1970).

L-ASAPRAGINASIC ACTIVITYIN SAPS OF CORN AND WHEAT LEAVES TREATED BY VACUUM-INFILTRATION WITH METABOLIC INHIBITORS

SUMMARY

We have studied the L-asparaginasic activity in the squeezed saps from corn and wheat plantlets leaves, which were vacuum infiltrated with metabolic inhibitors solutions. It has been found that both vacuolar and plasmatic saps have an asparaginasic activity that demonstrates the presence of asparaginase both in biostructure and in the matter outside it. Under the action of dinitrophenol, dichlorophenol, dinitronaphthol and sodium azide part of asparaginase is released from the biostructure.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 93–99 (1972)

INFLUENȚA IONULUI DE POTASIU ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN ACID PIRUVIC ȘI APĂ TOTALĂ ȘI ASUPRA EXOSMOZEI ACIDULUI PIRUVIC DIN MUȘCHIUL SARTORIUS DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Ionul de potasiu introdus în mediul de imersie al mușchilor sartorius de broască produce o scădere evidentă a conținutului în apă totală și acid piruvic, scăderea fiind proporțională în ambele cazuri cu creșterea concentrației de clorură de potasiu. În ciuda conținutului său mai scăzut în mușchi, exosmoza acidului piruvic nu este influențată de prezența K^+, ceea ce pledează pentru creșterea permeabilității musculare pentru acidul piruvic, sub acțiunea ionului K^+. Absența ionului de potasiu din mediul de imersie crește ușor cantitatea de apă totală, fără a afecta însă conținutul și exosmoza acidului piruvic. Efectul K^+ nu este specific, el fiind asemănător celui produs de Rb^+.

Însușirea celulelor de a acumula ionii de potasiu de preferință a celor de sodiu, dintr-un mediu cu concentrație mai ridicată în sodiu decît în potasiu, este dependentă de un proces de transport activ, energia necesară rezultînd din metabolismul celular [1]—[6].

Ar fi de așteptat ca studiul metabolismului muscular în timpul deplasărilor ionice să aducă lumină asupra mecanismului de selectare ionică [7].

Este cunoscut faptul că concentrația crescută a K^+ din soluția salină de imersie, afectează mușchiul în diferite moduri. Astfel, s-a înregistrat scăderea potențialului de repaus [8]—[11], creșterea conductibilității membranei [12] și a vitezei fluxului ionilor de sodiu [13], [14] și potasiu [15].

Metabolismul este de asemenea modificat, deoarece s-a semnalat creșterea căldurii de repaus [16], [17], a consumului de oxigen [18]—[20], conținutului în 3′5′ AMP [21] și producerii de acid lactic [18], [20]. Ionii K^+ scad de asemenea nivelul ATP-ului și al creatin fosfatului [7].

În ceea ce privește modificările de volum sub influența ionilor de potasiu, unii autori semnalează o imbibiție considerabilă a cortexului cerebral [22] respectiv a reticulului sarcoplasmatic de broască [23], în timp ce alții fie că nu găsesc modificări de volum la mușchii sartorius ai broaștelor Buffo [7], sau înregistrează micșorarea de volum la mușchii sartorius de broască [24].

Într-o lucrare anterioară am arătat [25] că Rb^+, care poate substitui K^+ și care în multe privințe se comportă asemănător acestui ion [26], [27], scade semnificativ conținutul în apă totală a mușchilor sartorius

de broască. Întrucît comportarea membranei musculare este identică față de ionii de potasiu și de rubidiu [28], ne putem aștepta să obținem rezultate asemănătoare la tratamentul cu K^+.

Pe de altă parte noi am evidențiat [25] scăderea — sub influența Rb^+ — a acidului piruvic, componentă importantă care leagă calea de degradare anaerobă de cea aerobă [29].

Ni s-a părut deci interesant să urmărim dacă nu cumva și ionul de potasiu adăugat mediului extern, induce modificări asemănătoare în condițiile descrise anterior [25]. Se știe că K^+ pătrunde în celulă în proporția creșterii sale externe [30].

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe mușchi sartorius de broască (*Rana ridibunda*). La două ore după ce măduva spinării a fost distrusă, mușchii au fost izolați cu grijă pentru a se evita orice lezare, șterși ușor pe hîrtie de filtru, cîntăriți și apoi imersați în soluțiile saline corespunzătoare.

S-a lucrat pe cîte doi mușchi proveniți de la două broaște. La martor, aceștia au fost imersați în 20 ml soluție Ringer- Jendrassik [31] conținînd la litru 6,5 g clorură de sodiu, 0,2 g clorură de calciu, 0,2 g clorură de potasiu și 0,1 g bicarbonat de sodiu. Pentru studierea efectului concentrațiilor diferite de ioni de potasiu asupra mușchiului sartorius de broască, doi mușchi simetrici cu cei martor erau introduși în același volum de soluție Ringer-Jendrassik ce conținea cantități de clorură de potasiu variind între 0 și 50 mM/l, ceilalți constituenți fiind în concentrația menționată mai sus.

Mușchii au fost imersați timp de 3 ore și jumătate, sub barbotare continuă și uniformă, cu un curent de oxigen 100%, la temperatura camerei. La intervale de aproximativ 20 min, conținutul vasului de imersie se agita ușor.

La introducerea în soluția Ringer cu concentrații de 20, respectiv 50 mM/l KCl, toți mușchii se contractau, dar contracția înceta în aproximativ 10 minute.

Mușchii simetrici ai aceleiași broaște au conținut asemănător în apă totală și acid piruvic și eliberează prin exosmoză practic aceeași cantitate de acid piruvic [25], fapt care permite folosirea unuia dintre mușchi drept martor.

La sfîrșitul perioadei de imersie, mușchii îndepărtați din soluția Ringer corespunzătoare, au fost imediat șterși ușor pe hîrtie de filtru. Conținutul în apă totală s-a determinat gravimetric prin cîntăriri înainte și după uscare pînă la greutate constantă și s-a exprimat în mg/g de substanță uscată.

La determinările de acid piruvic s-au folosit 2 grupe de cîte 2 mușchi tratați identic, date fiind cantitățile mici în care acest acid este prezent. Mușchii au fost șterși ușor pe hîrtie de filtru, mărunțiți, cîntăriți, apoi omogenizați la rece într-un omogenizator Potter cu 5 ml acid tricloracetic 10%, extractul tricloracetic fiind apoi centrifugat timp de 15 minute la 4500 rot/min. Determinarea acidului piruvic s-a făcut după metoda Friedeman și Haugen [32] modificată de Sacks [29] folosindu-se 3,5 ml din

extractul tricloracetic în prealabil lăsat timp de 24 de ore la 4°C, pentru evitarea interferenţei cu acidul oxalacetic. Acidul piruvic s-a extras cu xilen şi carbonat de sodiu prin agitare mecanică timp de 3 minute; faza de carbonat de sodiu a fost apoi centrifugată timp de 15 minute la 3000 rot/min. Pentru dezvoltarea culorii s-a folosit hidroxidul de sodiu 4%. Citirile s-au efectuat după 15 minute, la 420 mμ, valorile raportîndu-se la o curbă de referinţă făcută cu piruvat de litiu în condiţii identice. S-a determinat atît conţinutul în acid piruvic al muşchiului, cît şi cantitatea difuzată în soluţia înconjurătoare, pentru ca însumarea celor două valori să reflecte cantitatea de acid piruvic existentă la sfîrşitul experienţei.

Deoarece la determinarea de acid piruvic s-au folosit 2 grupe de cîte 2 muşchi trataţi identic, şi acidul piruvic exosmozat s-a determinat în amestecul celor două medii de imersie corespunzătoare muşchilor respectivi, din care s-au folosit 35 ml şi care au fost apoi deproteinizaţi cu 5 ml acid tricloracetic 10%. Tratamentul ulterior a fost identic ca la determinarea acidului piruvic din muşchi. Rezultatele au fost exprimate în mg/g muşchi umed cînd ne-am referit la conţinutul muşchilor în acid piruvic, iar valorile pentru acidul piruvic exosmozat din cele două perechi de muşchi în 40 ml soluţie Ringer, sînt exprimate în μg.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele trecute în tabela 1 se desprinde faptul că muşchii imersaţi în soluţie Ringer cu conţinut diferit în KCl conţin o cantitate de apă totală mai mică decît muşchii martor. Deshidratarea muşchilor este practic proporţională cu creşterea concentraţiei de clorură de potasiu în mediul de imersie.

Rezultatele noastre diferă de cele ale lui Briner şi colab. [7] care nu găsesc modificări de volum la muşchii sartorius de broască Buffo trataţi cu clorură de potasiu. Ele sînt concordante însă cu datele publicate de unii cercetători care constată descreşterea conţinutului în apă al muşchiului, ca o funcţie a concentraţiei osmotice a serului [33] sau a mediului de imersie [24], [34], şi cu unele cercetări efectuate pe alte organe, după care cantitatea relativă a apei totale este determinată de compoziţia mediului înconjurător [35]—[38].

Datele cuprinse în aceeaşi tabelă arată totodată că muşchii imersaţi în soluţie Ringer fără K^+ conţin o cantitate de apă totală uşor crescută faţă de cea a muşchilor imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik.

Tabela 2 arată că omiterea K^+ din mediul de imersie nu modifică producerea şi exosmoza acidului piruvic. Se confirmă astfel observaţia făcută pe muşchii sartorius de broaşte Buffo [20], precum şi pe cortex cerebral [39], [40] că omiterea K^+ din mediul de incubare nu induce modificări metabolice importante.

Clorura de potasiu în concentraţii de 10, 20, respectiv 50 mM/l produce o scădere evidentă în conţinutul muşchilor în acid piruvic. În evaluarea rezultatelor am ţinut seama de modificările de greutate ale muşchilor corespunzătoare fiecărei concentraţii de clorură de potasiu. Cantitatea de acid piruvic care exosmozează însă, nu este scăzută faţă de martor. Scăderea cantităţii de acid piruvic s-ar putea datori conversiei

Tabela 1

Conținutul în apă totală al mușchilor sartorius de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de KCl.

Mușchi tratat cu KCl=K; mușchi martor =M.

	Greutatea mușchilor g		Concentrația KCl mM/litru	Apă totală mg/g substanță uscată		Diferența mg/g substanță uscată
	M	K		M	K	
	0,22	0,24	0	3,93	4,00	+0,07
	0,24	0,26	0	4,02	4,12	+0,10
	0,23	0,21	0	3,96	4,02	+0,06
	0,24	0,26	0	3,80	3,89	+0,09
Media	0,23	0,24		3,93	4,01	+0,08
	0,27	0,27	10	4,00	3,82	−0,18
	0,29	0,28	10	3,88	3,79	−0,09
	0,26	0,28	10	3,75	3,69	−0,06
	0,26	0,25	10	3,70	3,62	−0,08
Media	0,27	0,27		3,83	3,73	−0,10
	0,19	0,18	20	4,52	4,36	−0,16
	0,26	0,25	20	4,03	3,86	−0,17
	0,18	0,19	20	4,09	3,85	−0,24
	0,22	0,24	20	3,99	3,83	−0,16
Media	0,22	0,22		4,16	3,97	−0,19
	0,16	0,17	50	4,05	3,49	−0,56
	0,18	0,20	50	4,29	3,65	−0,64
	0,22	0,20	50	4,15	3,50	−0,65
	0,20	0,19	50	3,94	3,39	−0,55
Media	0,19	0,19		4,11	3,51	0,60

piruvatului în acetil-CoA, ca și în cazul cercetărilor efectuate pe felii de cortex cerebral [41].

Printre factorii care pot influența exosmoza anumitor substanțe din mușchi, Macovschi și colab. [42] menționează modificările de permeabilitate musculară și eventuale modificări ale concentrației substanței respective în interiorul țesutului muscular, ca urmare a proceselor fizico-chimice, biochimice și fiziologice care se petrec în mușchi în urma tratamentului aplicat.

În ciuda conținutului său mai scăzut în mușchi sub influența ionului de K^+, valorile acidului piruvic difuzat în mediul de imersie sînt însă aceleași ca și în cazul martorului. Rezultatele noastre pot fi explicate dacă

Tabela 2

Conţinutul şi exosmoza acidului piruvic la muşchii sartorius de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik cu adaos de diferite concentraţii de KCl.

Muşchi tratat cu KCl = K; muşchi martor=M.

	Greutatea muşchilor g		Concentraţia KCl mM/litru	Acid piruvic în muşchi mg/g ţesut umed		Acid piruvic exosmozat µg/4 muşchi		Acid piruvic din muşchi + acid piruvic exosmozat µg/4 muşchi	
	M	K		M	K	M	K	M	K
	0,72	0,70	0	0,0250	0,0258	27	29	45	47
	0,68	0,70	0	0,0328	0,0340	33	30	53	55
Media	0,88	0,90	0	0,0306	0,0298	35	38	63	65
	0,76	0,77		0,0295	0,0299	31	32	54	56
	0,75	0,75	10	0,0350	0,0280	60	62	86	83
	0,73	0,75	10	0,0630	0,0523	42	38	89	77
	0,70	0,72	10	0,0445	0,0384	30	35	61	62
	1,00	0,98	10	0,0426	0,0400	92	92	135	131
Media	0,79	0,80		0,0463	0,0395	56	57	93	88
	0,63	0,62	20	0,0329	0,0199	38	40	59	52
	1,00	1,04	20	0,0354	0,0122	34	45	69	58
	0,68	0,66	20	0,0300	0,0180	24	29	45	40
	0,58	0,55	20	0,0412	0,0280	45	50	69	65
Media	0,72	0,72		0,0349	0,0195	36	41	60	54
	0,97	1,03	50	0,0470	0,0192	25	30	71	50
	0,50	0,51	50	0,0400	0,0156	29	26	49	34
	0,60	0,61	50	0,0329	0,0199	40	38	60	50
	0,57	0,55	50	0,0450	0,0250	36	40	61	53
Media	0,66	0,67		0,0412	0,0199	32	33	60	47

ţinem seama că, pe lîngă efectul de scădere a conţinutului în acid piruvic al muşchiului, K^+ determină totodată şi o creştere a permeabilităţii membranei musculare. Manifestarea concomitentă a acestor două efecte conduce la nivelarea valorilor acidului piruvic exosmozat din muşchiul tratat cu K^+ şi din cel simetric netratat.

Rezultatele cuprinse în lucrarea de faţă arată că, deşi datele din literatură menţionează o comportare diferită a K^+ faţă de Rb^+, în efectul său asupra glicolizei [20], noi obţinem şi în cazul K^+ o comportare similară cu cea a Rb^+ [25] în ce priveşte influenţa asupra producerii de acid piruvic, ceea ce denotă că efectul K^+ nu este specific.

CONCLUZII

1. Absenţa ionului de potasiu din mediul de imersie a muşchiului sartorius de broască are drept rezultat o uşoară creştere a cantităţii de apă totală.

2. Absența ionului de potasiu nu produce modificări în cantitatea și exosmoza acidului piruvic.

3. Ionul de potasiu adăugat mediului de imersie al mușchiului sartorius de broască produce: a) o scădere evidentă a conținutului în apă totală, scădere proporțională cu creșterea concentrației de clorură de potasiu din mediu; b) o scădere evidentă a conținutului în acid piruvic al mușchiului, scădere proporțională și în acest caz cu creșterea concentrației de clorură de potasiu din mediu; c) exosmoza acidului piruvic nu este influențată de prezența K^+ ceea ce pledează pentru creșterea permeabilității musculare pentru acidul piruvic sub acțiunea ionului K^+.

4. Ionul K^+ se comportă similar cu Rb^+, deci nu este specific.

Prezentat la redacție la 20 iulie 1971 *Institutul de biochimie București*

BIBLIOGRAFIE

1. A. Askari, Science, **141**, 44 (1963).
2. H. L. Jong, I. S. Edelman, Am. J. Physiol., **203**, 1008 (1962).
3. G. V. Van Rossum, Biochim., Biophys. Acta, **82**, 556 (1964).
4. A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, J. Physiol., **128**, 28 (1955).
5. H. G. Hempling, Biochim. Biophys. Acta, **112**, 503 (1966).
6. M. Dydynska, E. J. Harris, J. Physiol. London, **182**, 92 (1966).
7. G. P. Briner, S. E. Simon, R. Frater, P. Tasker, Biochim. Biophys. Acta, **35**, 485 (1959).
8. H. J. Curtis, K. S. Cole, J. Cell. Comp. Physiol., **19**, 135 (1942).
9. G. W. Ling, R. W. Gerard, J. Cell. Comp. Physiol., **34**, 383 (1949).
10. W. L. Nastuk, A. L. Hodgkin, J. Cell. Comp. Physiol., **42**, 427 (1953).
11. F. H. Shaw, S. E. Simon, B. M. Johnstone, M. E. Holman, J. Gen. Physiol., **40**, 263 (1956).
12. H. P. Jenerick, J. Cell. Comp. Physiol., **42**, 427 (1953).
13. C. Edwards, E. J. Harris, J. Physiol., **135**, 567 (1957).
14. R. D. Keynes, Proc. Roy. Soc. (London) B, **142**, 359 (1954).
15. E. J. Harris, J. Gen. Physiol., **41**, 169 (1957).
16. D. Y. Solandt, J. Physiol., **86**, 162 (1936).
17. A. V. Hill, J. V. Howarth, Proc. Roy. Soc. (London) B, **147**, 21 (1957).
18. A. H. Hegnauer, W. O. Fenn, D. M. Cobb, J. Cell. Comp. Physiol., **4**, 505 (1934).
19. I. Navatny, F. Yuskicil, L. Yyklicky, R. Beranek, Physiol. Bohemoslov, **11**, 277 (1962).
20. M. Muller, S. E. Simon, Biochim. Biophys. Acta, **37**, 107 (1960).
21. L. Lundholm, T. Rall, N. Venos, Acta Physiol. Scand., **70**, 127 (1967).
22. R. Rybova, Physiol. Bohemoslov, **9**, 116 (1960).
23. E. J. Harris, Biophys. Biochem. Cytol., **9**, 502 (1961).
24. V. I. Stabrovskaya, N. M. Nasvetayeva, A. D. Brown, Citologia, **9**, 1137 (1970).
25. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **3**, 319 (1971).
26. M. Lubin, P. B. Sneider, J. Physiol., **138**, 140 (1957).
27. R. H. Adrian, J. Physiol., **175**, 134 (1964).
28. P. S. Majora, Fiziol. Zh. Akad. Ukr. SSR, **3**, 107 (1962).
29. I. Sacks, R. V. Ganslen, I. T. Diffée, Am. J. Physiol., **177**, 133 (1964).
30. P. Boyle, E. J. Conway, J. Physiol., **100**, 1 (1941).
31. L. Jendrassik, L. Faiszt, Rolando Eotvos nominatae, Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
32. T. E. Friedeman, G. E. Haugen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
33. W.N. Mc Ferland, Publ. Inst. Mar. Sci., **10**, 179 (1965).
34. Y. V. Natschin, Zh. Obsch. Biol., **27**, 473 (1966).
35. A. Kleizeller, I. Nadvitkova, A. Knotkova, Biochim. Biophys. Acta, **135**, 286 (1967).
36. F. Curran, A. K. Solomon, J. Gen. Physiol., **41**, 143 (1957).
37. I. A. Karclay, E. J. Hambert, R. White, Biochem. J., **80**, 9P (1961).
38. E. Cotlier, B. Kwan, C. Beaty, Biochim. Biophys. Acta, **150**, 705 (1968).
39. F. G. Dickens, G. D. Greville, Biochem., J. **29**, 1468 (1935).

40. M. P. Gore, H. I. Mc.Ilwain, J. Physiol., **117**, 471 (1952).
41. M. M. Kini, J. H. Quastel, Nature, **184**, 252 (1959).
42. E. Macovschi, T. Rădulescu, L. Scolnic, St. cerc. biochim., **5**, 485 (1962).

THE EFFECT OF POTASSIUM IONS UPON PYRUVIC ACID AND TOTAL WATER CONTENT, AND UPON PYRUVIC ACID EXOSMOSIS FROM FROG SARTORIUS MUSCLES

SUMMARY

Potassium ions introduced in the imersion medium of frog sartorius muscles induce an evident decrease in total water and pyruvic acid content; this decrease is in both cases proportional to the increase in potassium chloride concentration. Despite the lower content în pyruvic acid of the muscles, its exosmosis is not influenced by K^+. This fact supports the idea of an increased muscular permeability for pyruvic acid, under the action of K^+.

The absence of potassium ion from the imersion medium, increases slowly the water content, without affecting the content and exosmosis of pyruvic acid. The effect of K^+ is not specific; it is similar to that produced by Rb^+.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 101–105 (1972)

DOZAREA APEI LIBERE ŞI LEGATE ÎN ŢESUTUL FOLIAR, PRIVITĂ ÎN LUMINA TEORIEI BIOSTRUCTURII

R. STĂNESCU

Rezumat. — Dozînd apa liberă din frunza întreagă a plantulelor de porumb, precum şi din frunzele tăiate în fragmente din ce în ce mai mici, vii sau în prealabil omorîte prin procedee diferite, am găsit cantităţi din ce în ce mai mari de apă liberă. Această creştere a procentului de apă liberă la frunzele omorîte se datoreşte măririi suprafeţei de contact dintre ţesutul foliar şi soluţia de zaharoză, iar la frunzele vii, pe lîngă mărirea suprafeţei de contact, intervine şi destrămarea progresivă a biostructurii sale.

Se admite în prezent că, în celulele vii, apa se găseşte sub două forme principale : „liberă", alcătuind citoplasma şi lichidul vacuolar, şi „legată", adică fixată de coloizii hidrofili. Se mai consideră că moartea celulelor nu este urmată de modificarea raportului dintre cele două forme ale apei celulare. De aceea, metodele elaborate pînă acum pentru determinarea apei libere şi a apei legate în materialul biologic nu ţin seama dacă materialul analizat este viu sau omorît. Se determină apa totală şi apa liberă, iar prin diferenţă se stabileşte proporţia apei legate.

Una dintre metodele de dozare a apei libere, folosită curent pentru ţesuturile vegetale, este metoda refractometrică, propusă de Dumanski [1] şi modificată de Okunţov şi Tarasova [2] şi Marincik [3]. Se consideră că, de cele mai multe ori, rezultatele analizelor privind apa liberă, efectuate după metoda menţionată, nu sînt concludente nici între ele, şi nici cu rezultatele ce se obţin prin alte metode [4], [5].

Cu totul altfel se prezintă problema apei celulare, dacă este privită de pe poziţiile teoriei biostructurii, elaborată în ultimul timp [6]. Conform acestei teorii, celulele vii conţin apa sub trei forme principale : „apa asimilată" sau integrată în biostructură (această apă nu are însuşiri de solvent), „apa liberă", care alcătuieşte lichidul vacuolar şi alte iichide din celulă, şi „apa legată" de coloizii hidrofili. Cum biostructura există numai în protoplasma vie şi se destramă o dată cu moartea acesteia, eliberînd apă şi alte componente din care este alcătuită, înseamnă că celulele moarte conţin apa numai sub două forme principale : „apă liberă" (dar în cantitate sporită faţă de materialul viu) şi apă legată.

Prin urmare, după teoria biostructurii, moartea celulelor este urmată de modificarea raportului dintre diferitele forme ale apei celulare. Dacă aşa stau lucrurile, se înţelege că nu este indiferent în ce stare este analizat materialul biologic respectiv ; în stare vie, el va da valori mai mici pentru

apa liberă decît atunci cînd este în prealabil omorît. Prin urmare, nu este exclus ca discordanţele dintre rezultatele analizelor efectuate după metoda Dumanski-Okunţov-Marincik să se datoreze tocmai acestui motiv. În acest sens vorbeşte şi faptul că după Dumanski se analizează materialul mojarat sau trecut prin sită, pe cînd după Okunţov-Marincik materialul se taie în rondele, o bună parte a lui rămînînd, probabil, vie.

Pentru a lămuri dacă gradul de destrămare a biostructurii, dependent de starea materialului vegetal analizat (viu, semiviu, sau omorît), influenţează rezultatele analizelor, am socotit necesar să efectuăm unele cercetări în acest sens.

MATERIAL ŞI METODĂ

Am dozat apa liberă în frunzele vii sau omorîte ale unor plantule de porumb, folosind metoda propusă de Okunţov-Marincik, dar, în loc să prelucrăm materialul tăiat în rondele cu diametrul de 6—10 mm (cum recomandă metoda), am tăiat frunzele transversal, în fîşii de aproximativ 1 ; 4 ; 15 mm lungime sau am folosit frunza întreagă. Plantulele (hibridul simplu 301) erau în vîrstă de 14—20 zile şi au fost crescute în condiţii de seră. Pentru omorîrea materialului am ţinut plantulele într-o atmosferă de eter sau cloroform, în exsicator, sau în pungi de plastic, la frigider, timp de 24 de ore.

Pentru dozarea apei libere am folosit 1 gram material vegetal verde, pe care l-am introdus într-o fiolă de cîntărire adusă la greutate constantă şi l-am tratat cu 2,5 ml soluţie de zaharoză, de concentraţia 25%. Fiola se cîntăreşte din nou, pentru a afla greutatea soluţiei de zaharoză adăugată, şi se lasă în contact cu materialul de dozat 2—3 ore, timp în care o parte din apa existentă în materialul vegetal (apa liberă) trece în soluţia de zaharoză, micşorîndu-i concentraţia. Cantitatea de apă liberă (apa cedată de ţesut) se calculează din greutatea finală a soluţiei de zaharoză şi se exprimă în procente din materialul verde. Pentru stabilirea concentraţiei soluţiei de zaharoză am folosit un refractometru Abbé, model G.

Apa totală am determinat-o prin uscarea materialului la 105°C pînă la greutatea constantă, iar apa legată am stabilit-o prin diferenţa dintre apa totală şi apa liberă.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Am centralizat în tabela 1 rezultatele dozărilor de apă liberă, apă legată, apă totală şi raportul apă liberă/legată, pentru toate fragmentele de frunză menţionate, analizate imediat după recoltare, în stare proaspătă. Datele reprezintă media aritmetică a cel puţin 15 determinări, la care am calculat eroarea medie.

Analizînd datele din tabelă se remarcă o creştere masivă a procentului de apă liberă pe măsură ce gradul de fragmentare al frunzelor creşte. Faţă de 14,7% apă liberă pentru frunzele tăiate în fîşii de 15 mm, se ajunge la 58,3% pentru frunzele tăiate în fîşii de 1 mm, ceea ce reprezintă o creştere de peste 390%. Această creştere masivă a procentului de apă liberă,

Tabela 1

Procente din material verde proaspăt

Porumb 14—20 zile	Apă liberă	Apă legată	Apă totală	Apă liberă/legată
Frunza întreagă	10,8±1,0	81,2±1,1	92,0±0,5	0,13
Fragm. de 15 mm	14,7±1,5	77,3±1,6	92,0±0,5	0,19
Fragm. de 4 mm	20,8±2,4	71,2±2,4	92,0±0,5	0,29
Fragm. de 1 mm	58,3±2,3	33,7±2,3	92,0±0,5	1,73

în funcţie de gradul fragmentării materialului analizat, poate avea două cauze : 1) cu cît fragmentarea este mai înaintată, cu atît suprafaţa de contact dintre ţesutul foliar şi soluţia de zaharoză creşte, uşurînd schimbul care se realizează între ele ; 2) fragmentarea progresivă a acestui ţesut provoacă o destrămare de asemenea progresivă a biostructurii lui, cu eliminarea unor cantităţi din ce în ce mai mari din apa „asimilată" a acestuia şi sporirea corespunzătoare a proporţiei de apă liberă.

Pentru a lămuri în ce măsură rezultatele de mai sus al determinărilor de apă liberă au fost influenţate de prima din cele două cauze menţionate, adică de mărimea suprafeţei de contact, am efectuat o nouă serie de determinări similare de apă liberă, folosind însă frunze şi fişii de frunze în prealabil omorîte prin trei procedee diferite. Rezultatele centralizate în tabela 2 arată că, după cum era de aşteptat, valorile găsite pentru conţinutul de apă liberă al materialului omorît sînt mai mari decît cele înregistrate la materialul viu corespunzător, deoarece prin omorîre biostructura acestuia a fost destrămată, cu eliberarea „apei asimilate" respective. Şi acum însă aceste valori cresc considerabil cu gradul de fragmentare. Cum în frunzele moarte fragmentarea nu mai poate avea nici un efect asupra biostructurii, aceasta fiind deja destrămată creşterea se datoreşte exclusiv măririi suprafeţei de contact.

Tabela 2

Apa liberă în procente din material verde omorît

Porumb 14—20 zile	Ţinut 24 ore în vapori de eter	Ţinut 24 ore în vapori de cloroform	Ţinut 24 ore la temp. +2°
Frunza întreagă	31,2±1,4	26,8±1,5	29,4±1,6
Fragm. de 15 mm	36,4±1,5	29,1±1,4	31,3±1,2
Fragm. de 4 mm	39,3±1,8	45,2±1,6	42,5±1,5
Fragm. de 1 mm	68,1±0,5	69,0±0,3	67,4±0,6

Am căutat să realizez o fragmentare încă mai înaintată a materialului analizat, şi anume fragmentele de frunze de 1 mm, introduse în fiolă şi tratate cu soluţia de zaharoză, le-am triturat cu ajutorul unei baghete de sticlă. Rezultatele dozărilor de apă liberă pentru materialul triturat,

indiferent de starea sa, viu sau omorît, nu se deosebeau de cele găsite pentru fragmentele de 1 mm. Valorile găsite sînt în medie de 62% pentru materialul viu şi de 66% pentru cel omorît.

Întocmind un grafic cu datele din tabelele 1 şi 2, şi anume înscriind pe ordonată procentele de apă liberă, iar pe abscisă mărimea fragmentului de frunză (socotind că dintr-un fragment de 15 mm se obţin 3,75 fragmente de 4 mm şi 15 fragmente de 1 mm) se constată tendinţa de apropiere a celor două curbe (fig. 1). Din figură se poate trage concluzia că la

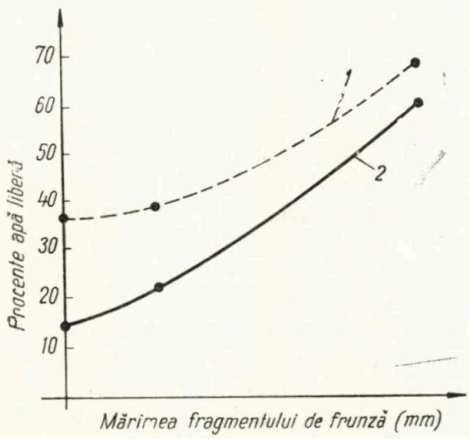


Fig. 1. — Variaţia apei libere în funcţie de mărimea fragmentului de frunză : *1* — material omorît; *2* — material viu

frunzele vii creşterea procentului de apă liberă se datoreşte, pe lîngă măririi suprafeţei de contact şi destrămării progresive a biostructurii. Dacă creşterea suprafeţei de contact ar fi singurul factor de care depind rezultatele dozărilor de apă liberă la frunzele vii, atunci cele două curbe ar trebui să fie paralele.

În concluzie, metoda refractometrică pentru dozarea apei libere în ţesuturile vegetale oferă rezultate care depind de doi factori : gradul de diviziune al materialului biologic examinat şi starea biostructurii lui.

Cantităţile de apă pe care soluţia de zaharoză le poate extrage din materialul biologic, într-un interval de timp dat, cresc cu cît gradul de diviziune al acestuia este mai înaintat.

La un acelaşi grad de diviziune, aceste cantităţi sînt considerabil mai mici la un material biologic încă viu, decît la unul mort, a cărui biostructură a fost complet destrămată.

Prezentat la redacţie la 23 aprilie 1971

Universitatea Bucureşti,
Facultatea de biologie,
Laboratorul de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. A. V. Dumanski, Kolloid. Z., **65**, 178 (1933).
2. M. M. Okuntov, E. N. Tarasova, D. A. N. SSSR **83**, 2 (1952).
3. A. F. Marincik, *Biologiceskie osnovi oroşaiemovo zemledelia*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1957.

4. J. D. Sayre, J. Agricult. Res., *44*, 669 (1932).
5. A. V. Dumanski, R. V. Voitkhovski, Kolloid. Z., **10**, 413 (1948).
6. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.

THE MEASUREMENT OF THE FREE AND BOUND WATER FROM THE FOLIAR TISSUES, IN THE LIGHT OF THE BIOSTRUCTURE THEORY

SUMMARY

Measuring the free water from the whole leaf of maize plantlets as well as from cut leaves, living or previously destroyed by various methods, we found greater and greater amounts of free water. This increase in percentage of the free water results from the growth of the contact surface between the foliar tissue and the saccharose solution, while, for the living leaves besides the growth of the contact surface, the progressive destruction of the biostructure also occurs.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 1, 107–109 (1972)

USCAREA GELURILOR PERLATE DE AGAROZĂ

VICTOR GHEȚIE și HORST D. SCHELL

Rezumat. — Se descrie un procedeu de trecere în stare uscată a gelurilor perlate de agaroză, fără ca acestea să-și piardă proprietățile lor fizico-chimice și mecanice.

În prezent este cunoscut faptul că gelurile de agaroză perlate utilizate în gel-filtrare (Sepharose^R, Sagarose^R) nu pot fi uscate fără reduceri considerabile de volum care, fiind ireversibile împiedică îmbibarea ulterioară; de aceea, gelurile sînt păstrate și livrate numai sub formă de suspensii.

Matricea gelului de agaroză este constituită din legături de hidrogen care unesc fibrele de agaroză moderat hidratate și orientate la întîmplare [1]. Structura gelului pare a nu fi asigurată numai de legăturile de hidrogen, deoarece s-a arătat că gelul nu este distrus în soluție de uree 8 M [2]. Ținînd seama de faptul că structura agarozei este constituită din unități repetitive de anhidro-galactoză [3] care are zone hidrofobe în moleculă (la C_3 și C_6), se poate presupune că structura gelului este asigurată și de forțe hidrofobe care se stabilesc între porțiunile apolare ale fibrelor. Astfel punctele de sudură ale fibrelor care se întretaie și alcătuiesc rețeaua pot fi asigurate prin interacțiuni hidrofobe, în timp ce porțiunile hidrofile ale fibrelor formează ochiurile rețelei. Scoaterea apei din aceste ochiuri în cursul uscării poate fi făcută fără ca rețeaua să sufere deformări ireversibile, dacă procesul are loc lent. Am constatat că acest lucru poate fi realizat supunînd perlele la o deshidratare blîndă, treptată, cu acetonă — solvent cu afinitate moderată pentru apă. De asemenea, pentru a preveni distorsiunile pe care rețeaua le-ar suferi în decursul uscării, ea poate fi rigidificată prin introducerea unor punți glicerice.

Uscarea cu acetonă s-a făcut astfel: s-au amestecat, de pildă, 100ml dintr-o suspensie densă, în apă, de perle de agaroză 6% preparate după metoda Hjertén [4] cu un volum egal de acetonă și s-a scuturat ocazional suspensia timp de 3 ore. După depunerea perlelor și decantarea supernatantului, s-a repetat operația încă de două ori. S-a lăsat suspensia în repaus peste noapte, la temperatura camerei, și apoi s-a filtrat la trompa de vid, spălînd perlele încă odată cu acetonă. S-a întins apoi materialul într-un strat cît mai subțire pe o placă Petri. Uscarea s-a făcut la temperatura camerei peste noapte.

Perlele de agaroză pot fi tratate înaintea uscării cu epiclorhidrină (0,5 ml sau 2,0 ml la 100 ml perle de agaroză depuse) după un procedeu descris mai înainte [5]. Perlele legate încrucișat sînt apoi uscate prin tehnica descrisă mai sus. În urma tratamentului perlele reîmbibate nu se mai dizolvă în apă, nici chiar la fierbere (0,5 ml epiclorhidrină/100 ml perle fiind cea mai mică cantitate care provoacă insolubilizarea perlelor).

Rehidratarea perlelor de agaroză uscate se face în apă distilată sau în tamponul Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M, utilizat în gel-filtrare. Fenomenul este rapid, în cîteva minute perlele ating forma sferică (fig. 1).

Măsurînd volumul gelurilor reîmbibate, se constată că ele sînt cu 8—10% mai mici decît fuseseră înainte de uscare, ceea ce înseamnă că perlele n-au atins exact dimensiunile inițiale.

Pentru determinarea coeficientului de partiție (K_{av}) s-a utilizat o coloană de 95/1 cm echilibrată cu tamponul folosit la îmbibarea gelurilor; viteza de eluție a fost de 12—15 ml/oră. Pentru etalonare s-au utilizat: albumina serică umană (M = 0,7 × 10^5) (N. B. Co), IgG de iepure obținut prin cromatografie (M = 1,5 × 10^5) și IgM de bou separat din gama-globulina de bou, fracțiunea II (Serva) (M = 9,0 × 10^5). Volumul spațiului gol (V_0) s-a determinat cu celule de *E. coli* liofilizate (Sagavac).

Variația coeficientului de partiție a diferitelor proteine etalon cu tratamentul la care a fost supusă agaroza înaintea uscării este redată în tabelă.

Tabelă

Variația coeficientului de partiție (K_{av}) a unor proteine etalon, pe diferite geluri de agaroză

Tratamentul aplicat perlelor de agaroză	Coeficientul de partiție (K_{av}) *la* :		
	IgM (GM 9.10^5)	IgG (GM 1,5.10^5)	albumină (GM 0,7. 10^5)
—	0,15	0,57	0,84
uscare blîndă cu acetonă	0,14	0,62	0,86
uscare după tratare cu epiclorhidrină 0,5%	0,09	0,50	0,86
uscare după tratare cu epiclorhidrină 2,0%	0,07	0,40	0,73

Rezultatele arată că uscarea blîndă cu acetonă a agarozei nu influențează cu nimic capacitatea sa de separare, diferențele observate fiind în limita erorilor metodei folosite. Tratarea cu epiclorhidrină determină o scădere a valorilor K_{av} pentru greutățile moleculare cercetate efect care este mai net la agaroza tratată cu epiclorhidrina 2,0/100 decît la cea tratată cu mai puțină epiclorhidrină, în special pentru greutăți moleculare mai mari de 1,5 × 10^5. Aceste rezultate indică faptul că tratarea cu epiclorhidrină modifică capacitatea de cernere moleculară a perlelor de agaroză. Tratarea cu epiclorhidrină (în special cu 2,0/100) scade limita superioară de rezoluție a agarozei 6% de la 2×10^6 pînă în apropiere de 10^6, ceea ce face ca acest gel să aibă caracteristicile unei agaroze 8%.

Uscarea blîndă cu acetonă a fost aplicată şi la gelurile de agaroză de care s-au legat proteine constatîndu-se că prin uscare nu se alterează nici antigenicitatea lor [5] şi nici proprietăţile lor enzimatice [6], ca şi cum gelul de agaroză ar avea o acţiune protectoare asupra proteinei.

În concluzie, gelurile de agaroză pot fi uscate prin deshidratare treptată cu acetonă, ele păstrîndu-şi capacitatea de reîmbibiţie şi conservînd activitatea biologică a proteinei ataşate de gel. Prin tratare cu epiclorhidrină gelurile dobîndesc stabilitate la temperaturi ridicate, de aceea ele pot fi sterilizate prin autoclavare.

Prezentat la redacţie la 16 ianuarie 1971

Institutul de biochimie,
Bucureşti

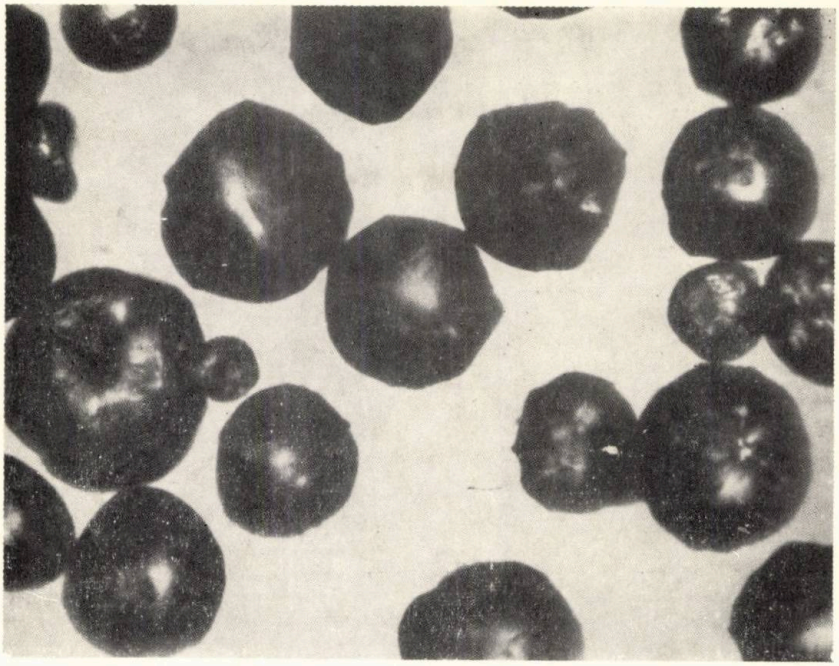
BIBLIOGRAFIE

1. T. C. Laurent, Biochim. Biophys. Acta, **136**, 199 (1967).
2. M. K. Joustra, în T. Gerritsen, *Modern separation methods of macromolecules and particles* Wiley, Interscience, New York, 1969, p. 195.
3. C. Araki, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 543 (1956).
4. S. Hjertén, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 393 (1964).
5. H. D. Schell, V. Gheţie, Rev. roum. biochim., **8**, 251 (1971).
6. H. D. Schell, V. Gheţie, Date nepublicate.

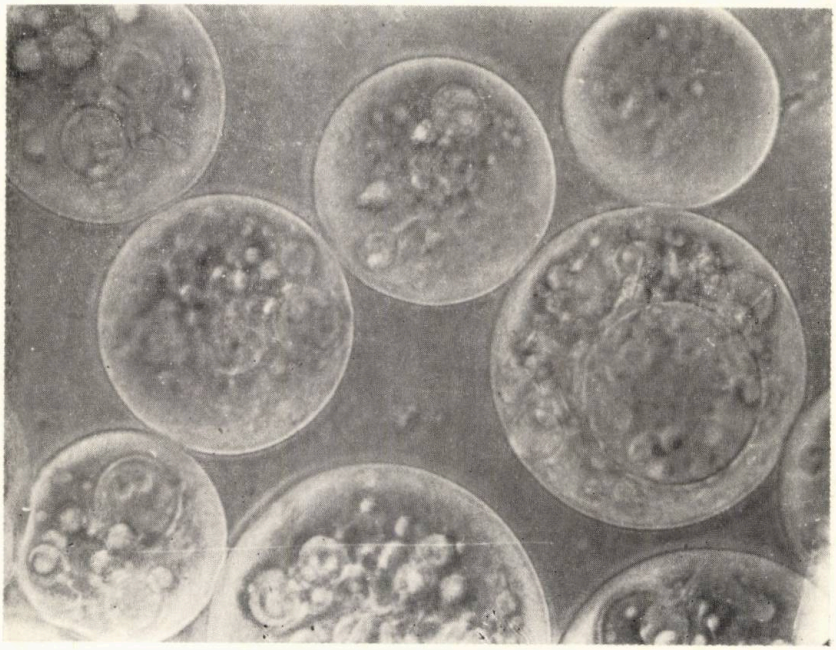
DRYING OF PEARLED AGAROSE GELS

SUMMARY

A procedure for drying pearled agarose gels without losing their physico-chemical properties is described.



a.



b.

Fig. 1. — Microfotografii ale gelurilor de agaroză :
a — uscat ; *b* — uscat şi reîmbibat.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 2, 111–115 (1972)

AMINOACIZII ÎN SUCUL FRUNZELOR DE VARZĂ ALBĂ ŞI AL FRUCTELOR DE MĂR, NEÎNCĂLZITE ŞI PREÎNCĂLZITE LA TEMPERATURI DIFERITE

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — S-a constatat că preîncălzirea ţesuturilor vegetale (frunze de varză, fructe de măr) determină apariţia, respectiv, dispariţia unor aminoacizi în sucurile stoarse din aceste ţesuturi. Mecanismul acestor fenomene va forma obiectul cercetărilor noastre viitoare.

În lucrările precedente am arătat că în urma preîncălzirii la temperaturi diferite, ţesuturile vegetale eliberează din biostructura lor cantităţi, importante de apă şi substanţe hidrosolubile [1], [2], proteine [3] etc.

În lucrarea de faţă am cercetat din acelaşi punct de vedere aminoacizii, urmărind prezenţa lor în sucul unor ţesuturi vegetale, atît înainte, cît şi după încălzirea acestora.

MATERIAL ŞI METODĂ

Am lucrat pe frunze de varză albă (*Brassica oleracaea*, var. *capitata* D. c. f. *alba*), detaşate de pe căpăţîni şi pe fructe de măr (*Malus domestica*) ajunse la maturitatea de consum.

Frunzele de varză se tăiau de-a lungul nervurii principale (nervura se arunca), jumătăţile din dreapta erau folosite ca martor, iar cele din stînga erau supuse preîncălzirii la temperaturi diferite. În total se alcătuiau patru perechi de probe, fiecare probă cîntărind 50 g.

Merele se tăiau în cîte 5 segmente egale şi se alcătuiau 5 probe de cîte 100 g, folosind pentru fiecare probă cîte un segment de la mai multe fructe din acelaşi soi.

Probele martor se păstrau la temperatura laboratorului (20–24°C) iar celelalte se introduceau în vase care se astupau ermetic, se cufundau, în băi marine şi apoi se încălzeau pînă la temperaturile de 40, 60, 80 şi 100°C, la care vasele erau menţinute timp de o oră. După răcire la temperatura laboratorului, toate probele se storceau pe rînd pentru obţinerea, sucurilor respective. Stoarcerea se realiza cu o presă hidraulică manuală, tip Hafico, model 2 litri. Presiunea se ridica încet şi se menţinea la 150 atm în cazul merelor, respectiv la 300 atm în cazul frunzelor de varză, pînă la încetarea scurgerii sucului.

După măsurarea volumului, sucurile se centrifugau timp de 20 minute, pentru sedimentarea eventualelor particule suspendate, şi apoi se trecea la identificarea aminoacizilor prezenţi în aceste sucuri, prin cromatografie pe hîrtie, după procedeul Mathias [4], folosind ca lichid de irigare amestecul de butanol, acid acetic, apă în proporţie de 4 :1 :5, iar ca revelator ninhidrina 0,1% în alcool etilic.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Din datele cuprinse în tabela 1 se constată următoarele :

În cazul frunzelor de varză albă păstrate la temperatura laboratorului (probe martor), precum şi al celor preîncălzite timp de o oră la 40°C, sucul cuprinde mai mulţi aminoacizi liberi, printre care au fost identificaţi următorii 14 : leucina, valina, metionina, triptofanul, tirozina, prolina, alanina, treonina, acidul glutamic, serina, glicina, acidul aspartic, histidina şi cisteina.

Este interesant că la sucurile stoarse din frunze preîncălzite la 60, 80 şi 100°C intervin unele schimbări, în sensul că unii aminoacizi dispar din suc, iar alţii apar. Aşa de exemplu, după preîncălzire timp de o oră la 100°C s-a constatat dispariţia valinei, alaninei şi glicinei şi apariţia lizinei.

La alţi aminoacizi asemenea schimbări încep să se manifeste chiar de la temperaturi mai joase. Astfel, tirozina dispare după preîncălzirea frunzelor de varză de la 80°C în sus, iar serina începînd de la 60°C în sus. În schimb asparagina, care lipseşte în sucurile frunzelor de varză martor, respectiv în sucul celor preîncălzite la 40°C, apare după preîncălzirea frunzelor la 60°C sau mai sus.

În cazul fructelor de măr (tabela 2) s-au constatat fenomene asemănătoare, cu deosebirea că numărul aminoacizilor liberi identificaţi în sucuri, în condiţiile noastre de cercetare, este mai mic decît în sucurile frunzelor de varză. Astfel, în sucul fructelor de măr martor, precum şi în cele preîncălzite timp de o oră la 40°C, am identificat 9 aminoacizi, şi anume leucina, valina, metionina, triptofanul, prolina, treonina, acidul glutamic, serina şi acidul aspartic.

Ca şi la frunzele de varză, am constatat că preîncălzirea merelor timp de o oră la temperaturi ridicate provoacă schimbări în numărul şi natura aminoacizilor prezenţi în sucuri. Aceste schimbări însă nu corespund celor constatate la sucurile frunzelor de varză. Aşa, de exemplu, preîncălzirea merelor începînd de la 60°C în sus determină dispariţia triptofanului, care nu dispare în sucurile frunzelor de varză, şi dispariţia prolinei şi a acidului aspartic începînd de la 80°C în sus, care de asemenea nu dispare în sucurile frunzelor de varză. O altă constatare se referă la alanină. Acest aminoacid lipseşte în sucurile fructelor de măr martor, dar apare în sucurile stoarse din mere preîncălzite începînd de la 60°C în sus.

Considerăm că apariţia, respectiv, dispariţia unor aminoacizi în urma preîncălzirii ţesuturilor vegetale, reprezintă un fenomen complex în cadrul căruia intervin atît relaţiile dintre aminoacizii liberi şi biostructurali, cît şi reacţiile biochimice care se produc la nivelul aminoacizilor

Tabela 1

Aminoacizii în sucul frunzelor de *varză albă* neîncălzite (martor) și preîncălzite timp de o oră la temperaturi diferite

Nr. crt.	Aminoacidul	Martor	Preîncălzite la :			
		24°	40°	60°	80°	100°
1	Leucina Izoleucina	+	+	+	+	+
2	Fenilalanina	−	−	−	−	−
3	Valina	+	+	+	+	−
4	Metionina	+	+	+	+	+
5	Triptofan	+	+	+	+	+
6	Tirozina	+	+	+	−	−
7	Prolina	+	+	+	+	+
8	Alanina	+	+	+	+	−
9	Treonina	+	+	+	+	+
10	Acid glutamic Oxiprolina	+	+	+	+	+
11	Serina	+	+	−	−	−
12	Glicina	+	+	+	+	−
13	Acie aspartic	+	+	+	+	+
14	Histidina Arginina	+	+	+	+	+
15	Asparagina	−	−	+	+	+
16	Lizina	−	−	−	−	+
17	Cisteina Cistina	+	+	+	+	+

Tabela 2

Aminoacizii în sucul *fructelor de măr* neîncălzite (martor) și preîncălzite timp de o oră la temperaturi diferite

Nr. crt.	Aminoacidul	Martor	Preîncălzite la :			
		24°	40°	60°	80°	100°
1	Leucina Izoleucina	+	+	+	+	+
2	Fenilalanina	−	−	−	−	−
3	Valina	+	+	+	+	+
4	Metionina	+	+	+	+	+
5	Triptofan	+	+	−	−	−
6	Tirozina	−	−	+	+	+
7	Prolina	+	+	+	−	−
8	Alanina	−	−	+	+	+
9	Treonina	+	+	+	+	+
10	Acid glutamic Oxiprolina	+	+	+	+	+
11	Serina	+	+	+	+	+
12	Glicina	−	−	−	−	−
13	Acid aspartic	+	+	+	−	−
14	Histidina Arginina	−	−	−	−	−
15	Asparagină	−	−	−	−	−
16	Lizină	−	−	−	−	−
17	Cisteină Cistină	−	−	+	+	+

liberi. Lămurirea acestor relaţii şi reacţii necesită însă efectuarea unor cercetări cantitative, cărora vor fi dedicate lucrările noastre viitoare.

CONCLUZII

Preîncălzirea ţesuturilor vegetale duce la modificarea conţinutului în aminoacizi al sucurilor ce pot fi stoarse din aceste ţesuturi. Această modificare constă însă fie în apariţia de noi aminoacizi, în sucurile stoarse din ţesuturile preîncălzite la temperaturi mai ridicate, în comparaţie cu cele stoarse din ţesuturile martor sau preîncălzite la temperaturi moderate, fie în disparţia din sucurile ţesuturilor preîncălzite la temperaturi ridicate a unor aminoacizi care se găsesc în sucurile martor sau preîncălzite la temperaturi moderate.

În primul caz, apariţia unor noi aminoacizi s-ar putea datora destrămării progresive a biostructurii ţesuturilor respective la ridicarea temperaturii sau unor procese de hidroliză a proteinelor, iar în cel de-al doilea dispariţia unora dintre aminoacizi s-ar putea explica prin reacţiile biochimice care au loc la nivelul lor.

Cercetările viitoare vor căuta că lămurească aceste cauze.

Prezentat la redacţie la 27 octombrie 1971

Catedra de biochimie,
Facultatea de biologie,
Universitatea Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
2. A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **14**, 57 (1971).
3. A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **13**, 281 (1970).
4. I. Alteras, N. Cajal, I. Cojocaru, S. Comoroşan, P. Dăncescu, T. Ieremia, V. Kondi, N. Mitrică, *Metodele laboratorului clinic*, Edit. medicală, Bucureşti, 1964, p. 72.

THE AMINO ACIDS FROM WHITE CABBAGE LEAVES AND APPLE FRUITS, UNHEATED AND PREHEATED AT DIFFERENT TEMPERATURES

SUMMARY

It was established that the heating of plants' tissues (cabbage leaves, apple fruits) brings about the appearance, respectively disappearance, of some amino acids in the juices obtained from these tissues. These phenomena's mechanism will be the subject of our future research.

ST. CERC. BIOCHIM., **15**, *1*, 117–122 (1972)

ULRICH WESTPHAL, *Steroid-protein interactions* (*Legăturile steroizi-proteine*), *Monographs on Endocrinology*, vol. 4, sub redacţia F. Gross, A. Zürich , T. Mann , L. T. Semuels şi J. Zander, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 568 p.

Lucrarea reprezintă o parte a unei serii monografice privind probleme de endocrinologie şi este axată în special pe lucrările şi interpretările obţinute de autor în laborator. Într-un cuvînt, se poate spune că autorul tratează interacţiunea dintre steroizi şi proteine aşa cum le-a studiat şi le-a văzut el însuşi, căutînd să dea în acelaşi timp cititorului o perspectivă care să cuprindă toate aspectele acestei probleme.

Tratarea problematicii respective îmbină armonios şi inteligibil largi domenii ştiinţifice de chimie-fizică, de biochimie, de endocrinologie şi de medicină generală, ceea ce presupune un real aport al acestei lucrări în rîndurile cititorilor.

Pentru o mai bună înţelegere, autorul îşi începe lucrarea cu un scurt capitol privind interacţiunea dintre proteine şi molecule mici sau ioni. Continuă cu metode de bază folosite la determinarea interacţiunii steroizi-proteine şi semnalează caracteristicile acesteia. Capitolele următoare tratează despre interacţiunea dintre steroizi şi proteinele serice, altele decît glicoproteinele specifice, şi influenţa structurii moleculare, despre corticosteroizi-globuline şi influenţa diferiţilor factori endogeni, despre interacţiunea progesteronei şi a altor steroizi cu acid α_1-glicoproteic.

În sfîrşit, în ultimele capitole, autorul semnalează efectele legăturii proteice asupra activităţii hormonale a steroizilor, dezvoltă condiţiile care fac posibile determinările radioimunologice ale hormonilor steroidici şi subliniază importanţa interacţiunii dintre steroizi şi enzime.

Lucrarea cuprinde 17 capitole, un index de subiecte şi un bogat material bibliografic. Ea aduce un real folos cititorilor în specialitate.

Mioara Cârsteanu
Institutul de biochimie
Bucureşti

D. B. RODYN, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Automated Enzyme Assays* (*Tehnici de laborator în biochimie şi biologie moleculară: Automatizarea determinărilor enzimatice*), editori T. S. Work şi E. Work, North Holland Publ. Comp., Amsterdam-Londra, 1970, 221 p., 74 fig.

Ţinînd seama de faptul că în ultimii ani interesul pentru sistemele de automatizare a determinărilor enzimatice a crescut foarte mult, iar aparatura este foarte diferită, autorul îşi propune să discute principiile generale ce stau la baza acestor sisteme, astfel încît cititorul să poată crea el însuşi un sistem automatizat de determinare, adecvat cercetărilor sale.

Avantajele importante ale unui asemenea sistem sînt evidente, mai ales în cazul unor determinări standard de rutină, pe un număr mare de probe, ca de exemplu în laboratoarele clinice, dar fără îndoială că el simplifică mult munca și în laboratoarele de cercetare.

După ce prezintă în capitolul 1 principiile și terminologia utilizată în automatizarea determinărilor enzimatice, autorul descrie pe scurt cîteva metode semiautomate (capitolul 2), folosite în general în enzimologie. Pentru exemplificarea modului de automatizare a unei determinări enzimatice simple, urmărind diferitele sale aspecte, autorul a ales autoanalizorul Technicon (capitolul 3), rezultatele și metodele fiind prezentate însă la modul general, aplicabil oricărui sistem automatizat. Capitolul 4 se ocupă de sisteme ce permit măsurarea vitezei inițiale de reacție și urmărirea în timp a unei reacții enzimatice : sisteme cu flux întrerupt și sistemele cu probe discrete prezentînd avantajele sau dezavantajele acestora față de sistemul în flux continuu. În capitolele următoare autorul prezintă principiile sistemelor automatizate de dozare a unei singure enzime (capitolul 5) sau a mai multor enzime dintr-o singură probă (capitolul 6) ; sînt analizate diferite aspecte ca : determinarea timpului de incubație, măsurarea activității în timp, relațiile între activitatea enzimatică și concentrația proteinei, paternul enzimatic, gradientul de enzime etc. Capitolul 7 redă modul de automatizare a studiilor de cinetică enzimatică comportînd determinări de specificitate de substrat, constante Michaelis, pH și temperatură optimă, stabilitate termică, efectul diferiților ioni, iar în capitolul 8 se prezintă prelucrarea datelor experimentale și calculul activității enzimatice. Capitolul 9 cuprinde o metodă generalizată și detaliată de automatizare a determinărilor activității enzimelor, principiile sale putînd fi aplicate și în determinările curente, neautomatizate.

Lucrarea este completată cu patru apendixuri cuprinzînd literatura apărută în acest domeniu (I), terminologia (II) și aparatura (III) utilizată, precum și un exemplu de programare pentru prelucrarea datelor la calculator (IV).

Bibliografia, deși bogată, nu este exhaustivă, autorul propunîndu-și nu atît să treacă în revistă toată literatura apărută cît mai degrabă să alcătuiască un ghid al tendințelor actuale de dezvoltare în domeniul automatizării determinărilor enzimatice.

Lucrarea se adresează mai ales biochimistului al cărui scop principal este de a determina nivelul activității enzimatice în diferite preparate biologice.

Olguța Macovschi
Facultatea de farmacie,
I.M.F. București

Metabolic Changes Induced by Alcohol (*Transformări metabolice induse de alcool*), ediție îngrijită de G. A. MARTINI și CH. BODE, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 217 p., 122 fig.

În ultimii ani se tinde tot mai mult să se considere alcoolul drept responsabil pentru multe modificări metabolice, prin interferența sa cu metabolismul lipidelor, carbohidraților și proteinelor, inclusiv enzime și hormoni, și prin influențele dăunătoare pe care le exercită asupra ficatului, musculaturii, inimii, creierului și rinichilor.

Interesul crescînd pentru această problemă face ca publicarea materialelor prezentate la Workshop Symposium, de către cercetători biochimiști, fiziologi, farmacologi, clinicieni și patologi ce lucrează în acest domeniu, să fie binevenită.

Comunicările prezentate au fost grupate în șase părți, fiecare comunicare fiind însoțită de discuțiile respective. În partea I, opt comunicări tratează despre metabolismul alcoolului și al alcooldehidrogenazei. Sînt prezentate astfel izoenzimele alcooldehidrogenazei, influența alcoolului asupra activității acestei enzime, oxidarea alcoolului și a metaboliților săi, metabolismul etanolului în ciroza ficatului și inducerea de către etanol a necrozei hepatice. În partea a II-a sînt prezentate două comunicări asupra modificărilor ultrastructurale induse de etanol în ficat. Partea a III-a cuprinde trei comunicări ce studiază efectul etanolului asupra activității enzimelor microzomale și interacția dintre oxidarea etanolului și metabolizarea medicamentelor. Cele cinci comunicări din partea a IV-a tratează despre efectul etanolului asupra metaboliților și coenzimelor metabolismului energetic. Sînt urmărite influențele metabolizării alcoolului în creier și în ficatul normal sau cu aspecte patologice.

În partea a V-a sînt prezentate 4 comunicări ce urmăresc efectele etanolului asupra metabolismului hidraților de carbon : influența etanolului asupra gluconeogenezei, glicogenezei și glicogenolizei sau interferența metabolizării sale cu calea Embden-Meyerhof-Parnas în ficat.

Ultima parte a lucrării, alcătuită din patru comunicări, se ocupă de influențele etanolului asupra metabolismului hormonilor. Se prezintă atît influența etanolului asupra metabolismului hormonilor steroizi, cît și originea și patogeneza acumulării de acizi grași în ficat, ca urmare a consumului prelungit de alcool.

Lucrarea pune la dispoziția cercetătorului un mare volum de date, bazate pe o bogată bibliografie adusă la zi (478 referințe bibliografice) și este bogat ilustrată.

Olguța Macovschi
Facultatea de farmacie,
I.M.F. București

Handbook of sensory physiology, vol.1, *Principles of Receptor Physiology* (*Manual de fiziologie senzorială. Principiile fiziologiei recepției*), editată de W. R. Loewenstein, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 600 p, 262 fig., 1700 indicații bibliografice.

Fiziologia senzorială a devenit, mai ales în ultimii ani, un domeniu în care se întîlnesc mai multe discipline științifice, fapt oglindit și în acest manual în care principiile fiziologiei recepției sînt cercetate din diferite puncte de vedere și cu diferite tehnici, contributorii fiind fiziologi, fiziceni, chimiști, geneticieni și psihologi, savanți cu renume ca : W. R. Loewenstein, R. A. Cone, D. E. Goldman, M. Jacobson, C. K. Cnox, L. E. Lipetz, D. Nachmansohn, S. S. Stevens, C. A. Terzuolo (S. U. A.) ; C. M. Curry (Canada), A. Klock, T. Teorell (Suedia), A. Oplatka (Israel), L. Tauch (Franța) etc.

În cele 17 capitole ale sale, primul volum al manualului, prezintă o considerare actuală a faptelor cunoscute și aduce o serie de date noi în problemele deschise în acest domeniu.

În capitolul 1 sînt prezentate modele contractile și mașini mecano-chimice și se fac diferite considerații termodinamice asupra conversiei mecano-chimice. Capitolul II, intitulat „Proteinele în bioelectricitate, rolul acetilcolinesterazei și al receptorului", cercetează rolul acestora în membranele excitabile (localizare, efectele activatorilor și inhibitorilor, acțiunea compușilor organo-fosforici asupra conducției etc.). Capitolul III se ocupă de transmisia în membranele receptoare sinaptic-neurale, iar în capitolul IV se face o clasificare a sistemelor senzoriale care aduc datele în neuronii senzoriali. În capitolul V, intitulat „Formarea conexiunilor neurale în

sistemele senzoriale", sînt expuse inervarea senzorială, inducţia receptorilor, efectul denervării şi reinervării asupra receptorilor, dezvoltarea circuitelor neurale etc. Capitolul VI tratează despre aspectele fiziologice şi psihologice ale intensităţii senzoriale. Capitolul VII se ocupă de funcţiile senzoriale şi rezultatele neurale, iar capitolull VIII de generarea răspunsurilor în receptori (definirea şi morfologia receptorilor, impulsurile nervoase generate de receptori etc.). Capitolul IX tratează despre transducţia mecano-electrică, iniţierea impulsurilor senzoriale în mecano-receptori (centrii şi modele de transducţie etc.). În capitolul X este prezentat un mecano-receptor artificial, bazat pe ecuaţii matematice relativ simple. În capitolul XI se arată că axonii nervoşi sînt cei care răspund primii la anumiţi stimuli chimici şi electrici, între forţa aplicată şi răspunsul axonului intervenind diferite etape. În capitolul XII se studiază receptorii vizuali, modul cum o singură moleculă de pigment vizual, absorbind un foton, poate iniţia un răspuns. În capitolul XIII sînt date relaţiile între fototaxie şi fotosinteză, între intensitatea luminii şi răspuns, acţiunea şi absorbţia spectrală, localizarea fotoreceptorilor etc. Capitolul XIV studiază principiile de bază, structura şi funcţiile celulelor de păr, care îndeplinesc o serie de funcţii în diferite organe de auz şi echilibru. În capitolul XV sînt prezentate structura, proprietăţile generale, sensivitate şi extensie, mecanismul excitaţiei şi mecanismul ionic, în fusul neivos al muşchiului de broască. Capitolul XVI este intitulat „Comportarea statică şi dinamică a organelor receptoare la crustacee", iar capitolul XVII : „Modele de organizare a receptorilor senzoriali periferici".

Lucrarea este utilă specialiştilor prin faptul că dă o privire de ansamblu asupra stadiului actual în fiziologia senzorială, deschizînd astfel drumul spre cercetarea aspectelor necunoscute încă în acest domeniu.

Natalia Moldoveanu
Institutul de biochimie
Bucureşti

Mammalian reproduction (*Reproducerea mamiferelor*), sub redacţia H. GIBIAN şi E. J. PLOTZ, Al 21-lea Colocviu al Societăţii de chimie biologică, 3—11 aprilie 1970, Mosbach-Baden, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 470 p., 255 fig.

Tema unui mare număr din referatele prezentate la cel de al 21-lea Colocviu al Societăţii de chimie biologică, de la Mosbach, în 1970, a fost biosinteza şi activitatea biologică a hormonilor sexuali. Citäm : *Biogeneza androgenilor* (E. Steinberger-Philadelphia) ; *Biosinteza, secreţia şi acţiunea biologică a hormonilor sexuali femenini* (M. B. Lipsett — Bethesda) ; *Semnificaţia hormonilor în diferenţierea sexului mamiferelor, evidenţiată prin experienţe cu androgeni sintetici* (W. Elger şi alţii — Berlin) ; *Hormonul LHR hipotalamic : chimie, fiziologie, efect asupra omului* (A. V. Schally şi alţii — New Orleans) ; *Aspecte comparative ale reglării hipofizare a funcţiilor sexuale* (H. Karg, D. Scharus-Freising Weihenstephan) ; *Asupra identităţii hormonilor LHR şi FSHR* (W. F. White — Chicago de nord) ; *Efectele hormonale asupra comportamentului sociosexual al ctinilor* (F. A. Beach — Berkeley).

Colocviul s-a ocupat de asemenea de aspecte imunologice (H. Krieg-Würzburg), cibernetice (N. B. Schwartz — Chicago) şi genetice (R. G. Edwards — Cambridge). În acelaşi context se înscrie şi referatul asupra erorilor înnăscute din steroidogeneză şi în acţiunea steroizilor (A. S. Goldman — Philadelphia).

O altă serie de lucrări au fost consacrate fiziologiei și biochimiei generale a reproducerii mamiferelor. Biochimia și biologia spermei și plasmei seminale sînt obiectul a două referate (J. M. Bedford — New York; C. Ruhenstroth — Bauer — München). Un referat general deosebit de interesant, și care a constituit punctul de plecare al discuțiilor colocviului, s-a axat pe fiziologia reproducerii și bazele ei evolutive (A. Jost — Paris). Alte lucrări au tratat despre rolul uterului în reglarea periodicității ovariene (B. V. Caldwell — Shrewsbury), capacitatea lui de menținere a sarcinii în prezența substanțelor inhibitoare (H. Jung — Aachen), relația dintre secreția endometrului și primele faze de dezvoltare a fătului (H. M. Beier și alții — Marburg). Trei lucrări interesante vizează transportul ovulului (H. Koester — Giessen), metabolismul acestuia între etapa de concepție și de nidare (R. L. Brinster — Philadelphia), rolul său în controlul și menținerea sarcinii (R. M. Moor — Cambridge).

Participarea unor personalități științifice remarcabile a asigurat materialelor colocviului un nivel științific deosebit de înalt atît sub raportul tematicii, cît și al metodicii. Acest fapt este o garanție a interesului pe care volumul îl prezintă pentru toți oamenii de știință preocupați de domeniul respectiv.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie
București

SUSUMU OHNO, *Evolution by Gene Duplication* (*Evoluția prin duplicarea genelor*), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970, 160 p., 24 fig., 6 tabele, 8 planșe cu microfotografii.

Lucrarea este deosebit de interesantă pentru biochimiști, biologi, paleontologi, pentru că atacă problemele fundamentale ale apariției și evoluției vieții, cu ajutorul celor mai recente realizări ale biochimiei. Un plus de atractivitate provine din faptul că autorul și-a propus să facă în așa fel încît ceea ce scrie să nu fie „depășit înainte de a fi publicat" și a dezvoltat caracterul anticipativ al lucrării, chiar dacă prin aceasta, conștient, a depășit limitele a ceea ce, astăzi, este mai mult sau mai puțin general acceptat.

Lucrarea cuprinde 5 părți: *Apariția vieții prin interacțiunea purinelor cu bazele pirimidinice*; *Mutația și natura conservativă a selecției naturale*; *De ce duplicația genelor?*; *Mecanismul duplicației genelor*; *Evoluția genomurilor vertebratelor*.

Ideea de bază este că selecția naturală a fost foarte eficientă în controlul mutațiilor întîmplătoare și, prin aceasta, extrem de conservatoare. Ea a acționat în sensul păstrării secvenței fundamentale a fiecărei gene, și nu ca mediator al unor schimbări ce puteau deveni ereditare. Autorul împărtășește ideea că dacă evoluția ar fi depins numai de selecția naturală, dintr-o bacterie n-ar fi putut lua naștere decît numeroase forme de bacterii, apariția metazoarelor, a vertebratelor, a mamiferelor fiind practic imposibilă, deoarece asemenea progrese enorme în evoluție au cerut gene noi, cu funcțiuni inexistente anterior.

Factorul major al evoluției este considerat a fi duplicarea genelor și a întregului genom, proces datorită căruia, creîndu-se poziții noi pentru gene, în care se pot acumula mutații ce în mod normal sînt eliminate de selecția naturală, apar funcțiuni noi ale organismului. Apariția de gene noi — caractere și funcțiuni noi — este fixată, la început, în populații reduse, prin

încrucișări între indivizi apropiat înrudiți, proces care, chiar la om, a fost totdeauna mult mai frecvent decît sîntem înclinați să credem.

Duplicările fundamentale pentru evoluție par a se fi produs în stadii foarte timpurii ale acesteia ; celule somatice ale unui individ sînt capabile să conțină vreme foarte îndelungată gene suplimentare, nefolosite, care abia mult mai tîrziu să se dovedească utile. Maximul de șanse pentru speciație coincide, probabil, cu schimbările drastice ale condițiilor de mediu, așa cum arată istoria apariției omului și a multor specii animale din trecutul geologic.

În lucrarea lui Ohno, toate ideile enunțate apar drept concluzii ale ultimelor descoperiri ale biochimiei. Așa de pildă, stabilirea structurii moleculare a DNA a făcut posibilă compararea secvențelor de aminoacizi din lanțurile de peptide omoloage, la diverse specii ; natura structurală a genelor s-a dovedit a fi extrem de conservativă, ceea ce a condus la concluzia că mutațiile întîmplătoare ale genelor nu pot fi considerate factor hotărîtor al evoluției. Pe de altă parte, aprecierea dimensiunilor genomului după cantitatea de DNA conținută a creat posibilitatea comparării acestora și, deci, a condus la un nou element util în discuțiile asupra filogenezei. În toate problemele abordate, Ohno merge pînă la extremul detaliu biochimic, pe care îl interpretează căutînd posibilitatea obținerii unei generalizări.

Sanda Rădulescu
Institutul de biochimie
București

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

E. MACOVSCHI, **Biostructura**, 1969, 258 p., 18,50 lei.

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici şi virali**, 1966, 375 p. + 8 pl., 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., + 18 pl., 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

*** **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 628 p. + 2 pl., 50 lei.

1972 MAR 1 41

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — Toute commande à l'étranger sera adressée à Intreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Boîte postale 134 — 135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 15, Nr. 1, p. 1—122, BUCUREŞTI, MARTIE, 1972

I. P. „Informaţia" — c. 3079

43816

Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 15

1972

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 3, p. 239–336, Bucureşti, septembrie, 1972

SCBIA5 15 (3), 239–336 (1972)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuţa poştală 2001 — telex 011631, Bucureşti, România, sau la reprezentanţii săi din străinătate.

În ţară revistele se pot procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE AL EDITURII ACADEMIEI.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie", pe adresa:
Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20, sectorul 1

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, str. Gutenberg nr. 3 bis, sectorul 6

MUSZAKI KÖNYVTÁR

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 15, nr. 3 1972

SUMAR

Pag.

I. ABRUDAN-BODEA şi I. PROINOV, Rolul nucleului celular în procesul de energogeneză. IV. Particularităţile glicolizei în nucleele ficatului de şobolan 243

I. BRAD, Z. MARCU, E. MOLDOVEANU, E. DOBRESCU şi C. MILICĂ, Variaţia spectrului izoperoxidazelor în timpul perioadei de iernare în rădăcina şi frunza de grîu 251

E. HADARAG, Izoenzimele pirofosfatazei anorganice din ţesuturi animale . 255

V. JURCĂ şi D. MATEI, Compuşii fosfatici şi activitatea fosfomonoesterazelor din eritrocite la păstrăvul-curcubeu (*Salmo gairdneri*) în insuficienţa vitaminelor B 263

A. MIHĂESCU, Cantitatea şi concentraţia sucurilor plasmatice obţinute din frunze de varză albă şi varză roşie, preîncălzite la temperaturi diferite şi din mere, pere şi gutui, păstrate la temperatura ambiantă 271

E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN şi Y. COPELOVICI, Corelaţii între efectul unor inhibitori metabolici, activitatea lactat- şi succinat-dehidrogenazei şi procesul de replicare a virusului urlian 279

L. SCOLNIC, Influenţa ionilor de potasiu asupra permeabilităţii şi conţinutului în apă totală şi acid lactic la muşchii sartorius şi gastrocnemian de broască 289

R. STĂNESCU, Eliberarea fosfatazei acide din biostructura plantulelor de porumb în funcţie de concentraţia inhibitorilor metabolici 299

A. SUGIU şi R. IENCICA, Sinteza de proteine şi nivelul acizilor nucleici în felii de ficat, sub acţiunea protectoare a acidului L-aspartic 305

A. ZAMFIRESCU şi I. HURGHIŞIU, Modificarea conţinutului în aminoacizi liberi la *Tenth redo arcucta* Först. în cursul perioadei de imago 311

V. TĂMAŞ, Unele aspecte ale metabolismului carotinoidelor în plante (referat general) 315

RECENZII 325

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tome 15, No. 3 1972

CONTENTS

Page

I. ABRUDAN-BODEA, I. PROINOV, Role of the cellular nucleus in energogenesis. IV. Peculiarities of the glycolysis in rat liver nuclei 243

I. BRAD, Z. MARCU, E. MOLDOVEANU, E. DOBRESCU, C. MILICĂ, The variation of isoperoxidase pattern in the wheat root and leaf, during hibernation 251

E. HADARAG, Inorganic pyrophosphatase isoenzymes in the mammalian tissues 255

V. JURCĂ, D. MATEI, Phosphate compound and the phosphomonoesterase activity in erithrocytes in *Salmo gairdneri* in vitamin B deficiency . . 263

A. MIHĂESCU, The amount and concentration of plasmatic saps obtained from leaves of white and red cabbage, previously heated at different temperatures as well as from apples, pears and quinces kept at room temperature 271

E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN, Y. COPELOVICI, Correlations between the effect of some metabolic inhibitors, lactate and succinate dehydrogenase activities and the replication process of the urlian virus 279

L. SCOLNIC, The effect of potassium ions upon permeabillity, total water and lactic acid content of frog sartorius and gastrocnemian muscles . . . 289

R. STĂNESCU, Release of the acid phosphomonoesterase from the biostructure of maize seedlings depending on the concentration of inhibitors . 299

A. SUCIU, R. IENCICA, Protein synthesis and nucleic acid level in liver slices under the protecting influence of L-aspartic acid 305

A. ZAMFIRESCU, I. HURGHIŞIU, Modification of the content in free amino acids in *Tenthredo arcuata* Först. during the imago period. 311

V. TĂMAŞ, Some aspects on carotenoid metabolism in plants (general report) 315

BOOK REVIEW 325

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 3, p. 239—336, Bucureşti, septembrie 1972

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 243–249 (1972)

ROLUL NUCLEULUI CELULAR ÎN PROCESUL DE ENERGOGENEZĂ

IV. PARTICULARITĂȚILE GLICOLIZEI ÎN NUCLEELE FICATULUI DE ȘOBOLAN

ILEANA ABRUDAN-BODEA și I. PROINOV

Rezumat.—Se studiază glicoliza aerobă și anaerobă a nucleelor din ficatul de șobolan cu diferite substrate și cofactori. Nucleele izolate prezintă o activitate glicolitică importantă cu substrate endogene. Dintre substratele exogene (glucoză, glucozo-6-fosfat, fructozo-1,6-difosfat, fosfoenolpiruvat și S_{1a}-supernatant celular deproteinizat și delipidat), randamentul maxim este dat de fructozo-1,6-difosfat. Glicoliza nucleară este inhibată cu supernatant celular deproteinizat (SCD). Nucleozidele purinice activează glicoliza, în timp ce ATP sau NAD nu influențează formarea de acid lactic. Se apreciază din rezultatele obținute capacitatea de sinteză a ATP prin glicoliză în nucleele din ficatul de șobolan.

Glicoliza nucleară a fost pusă în evidență de Siobert pe ficatul de șobolan, rinichiul și creierul de bou [1], [2] și de Allfrey pe nucleele din timusul de vițel [3], [4].

S-au identificat enzimele glicolitice și metaboliții respectivi în nucleu și s-a măsurat $^{14}CO_2$ eliberat din substrate marcate radioactiv. S-a studiat, de asemenea, rolul glucozei și inozinei ca substrate în glicoliza nucleelor de timus de șobolan [5].

Întrucît și procesele oxidative din nucleele ficatului de șobolan prezintă anumite particularități față de procesele oxidative din nucleele din timus, am încercat să caracterizăm glicoliza pe nucleele ficatului de șobolan în prezența sau în absența unor substrate exogene.

MATERIAL ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate pe șobolani albi de laborator de 150–250 g.

Izolarea nucleelor din ficatul de șobolan s-a făcut conform metodei descrise de noi într-o lucrare anterioară [6], cu deosebirea că după ultima centrifugare preparatul nuclear este reluat în KCl 0,154 M și nu în zaharoză, care interferează cu reacția de culoare pentru acidul lactic.

Separarea și fracționarea supernatantului celular deproteinizat (*SCD*) au fost descrise anterior [7] și constau, în esență, în centrifugarea omogenatului de ficat pentru sedimentarea organitelor, precipitarea proteinelor

cu metanol 80% şi concentrarea şi liofilizarea supernatantului deproteinizat. Pentru obţinerea fracţiunii delipidate S_{la}, o cotă-parte din SCD este tratată cu cloroform, distilată la vid şi liofilizată.

Glicoliza s-a urmărit prin cantitatea de lactat formată în vase Warburg, cu agitare timp de 60 min la 35°C, la volum final de reacţie de 3 ml. Mediul de incubare şi diferitele substrate sau cofactori adăugaţi au variat de la o experienţă la alta, fiind indicaţi în fiecare tabelă în parte. Condiţiile anaerobe s-au obţinut prin barbotarea timp de 5 min a unui curent de azot în mediul de incubare.

Dozarea acidului lactic s-a făcut prin reacţia de culoare dată de acetaldehidă cu parahidroxidifenilul [8]. Rezultatele sînt exprimate în μ moli de acid lactic/mg de proteină/oră.

Determinarea proteinelor s-a făcut după metoda Lowry [9], citind culoarea obţinută cu reactivul Follin-Ciocâlteu la 660 mμ în cuva de 1 cm, raportat la o curbă de albumină pură. Adaptarea metodei la scara microanalitică s-a făcut astfel: la 5 μl de suspensie nucleară diluată cu apă 1 : 1 s-a adăugat 0,2 ml de apă, 1 ml de reactiv A+B (Na_2CO_3 + $CuSO_4$ în tartrat de Na şi K) şi 0,1 ml de reactiv Follin de diluţie 1 : 1. Extincţia probei este citită după 30 min faţă de un martor care în locul suspensiei nucleare, conţine apă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt prezentate rezultatele privind formarea de acid lactic prin incubarea nucleelor de ficat de şobolan cu diferite substrate în condiţii aerobe şi anaerobe. Activitatea glicolitică a nucleelor cu substrat endogen este destul de mare, glucoza şi esterii ei fosforilaţi determinînd diferite grade de stimulare, analog procesului citoplasmatic cunoscut. Cel mai activ s-a dovedit fructozo-1,6-difosfatul, în timp ce riboza nu influenţează producerea de acid lactic. În prezenţa SCD se înregistrează o inhibare a procesului, în timp ce S_{la} (SCD delipidat) creşte producţia de lactat, asemănător glucozei. Formarea de acid lactic este mai mare în anaerobioză decît în aerobioză, indiferent de natura substratului adăugat.

În tabelele 2, 3 şi 4 sînt prezentate rezultatele privind efectul unor activatori şi inhibitori ai glicolizei. ATP şi NAD, factori importanţi de reglare a activităţii enzimelor glicolitice din citoplasmă, nu modifică semnificativ producţia de lactat în nuclee în prezenţa sau în absenţa substratelor exogene (tabela 2). În schimb, adenozina creşte rata producerii de acid lactic (tabela 3). La concentraţiile folosite, atît NaF, cît şi ADN-aza inhibă în proporţie de 100% procesul glicolitic nuclear (tabela 4).

Mecanismul formării ATP, necesar proceselor nucleare endergonice, este şi astăzi o problemă deschisă. Siebert [2], prin determinări manometrice ale glicolizei, calculează că nucleele ficatului de şobolan formează 60 μmoli ATP/oră/g de greutate uscată, ceea ce ar constitui o cantitate suficientă pentru nevoile energetice ale nucleului.

Deşi au fost descrise enzime din lanţul respirator şi în nucleu, natura substratelor oxidate şi semnificaţia oxidărilor în sinteza compuşilor macroergici sînt neclare [10].

Tabela 1

Glicoliza nucleelor de ficat de şobolan în prezenţa diferitelor substrate

Substrat	Aerob						Anaerob					
	exp. 1			exp. 2			exp. 1			exp. 2		
	Acid lactic	% activ.	ATP **	Acid * lactic	% activ.	ATP **	Acid * lactic	% activ,	ATP **	Acid * lactic	% activ.	ATP **
Fără	8,32	100	8,32	6,48	100	6,48	17,52	100	17,52	11,10	100	11,10
Glucoză	13,60	161	13,60	13,27	204	13,27	35,05	200	35,05	21,12	190	21,12
Gl. 6-P	18,01	214	27,01	16,39	250	24,60	40,31	230	60,46	32,68	294	49,02
Riboză	10,04	119	10,04	8,90	130	8,90	17,81	102	17,81	5,32	48	5,32
Fr. 1,6-PP	—	—	—	—	—	—	74,78	429	148,56	42,18	380	84,36
PEP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26,30	237	26,30
SCD	—	—	—	consum de lactat			7,09	40	7,09	2,60	32	2,60
S_{la}	12,45	149	12,45	11,32	172	11,32	—	—	—	23,96	215	23,96

* — μ moli acid lactic/g de proteină/60 min; ** — μ moli ATP/g de proteină/60 min, calculat considerînd că substratul endogen, glucoza, SCD, S_{la} şi riboza dau prin glicoliză 1 mol ATP/mol lactat, glucozo-6-fosfatul : 1,5 moli ATP/mol de lactat şi fructozo-1,6-difosfatul 2 moli ATP/mol lactat; PEP = acid fosfoenolpiruvic. Mediul de incubare conţine la volum final de 3 ml : tampon fosfat pH = 7,8 40 mM, ATP = 5 mM, $MgCl_2$ = 16 mM, nicotinamidă = 6,6 mM, NAD = 1 mM, substrate 5 mM, SCD şi S_{la} 0,2 ml; suspensia nuclee 1,5 ml (conc. 10 mg de proteină/ml). Rezultatele reprezintă media a cinci experienţe.

Tabela 2

Influenţa ATP şi NAD asupra glicolizei nucleelor din ficatul de şobolan

Adaos	Substrate					
	fără *	SGD *	S_{la} **	glucoză **	Gl 6-P**	Fr. 1,6-PP **
+ ATP + NAD	6,48	consum lactat	23,14	35,05	40,31	74,78
− ATP + NAD	4,58	,,	23,38	51,41	38,91	77,73
+ ATP − NAD	4,17	,,	24,06	40,06	47,03	67,26
− ATP − NAD	5,83	,,	24,68	36,22	42,80	68,51

* = aerobioză; ** = anaerobioză.

Condiţiile de lucru şi mediul de incubare sînt indicate în tabela 1. Mediul de incubare nu conţine ATP şi NAD, acestea fiind adăugate ulterior direct în vasele de reacţie, în concentraţii finale de ATP 5 mM, NAD 1 mM, conform cu indicaţiile din tabelă.

Rezultatele sînt date în micromoli de acid lactic format timp de 60 min/g de proteină la 35° C şi exprimă media unui număr de cinci experienţe.

Tabela 3

Influenţa adenozinei asupra glicolizei nucleelor de ficat de şobolan

Nucleozid	Substrat							
	fără **		glucoză *		Gl. 6-P **		S_{la} **	
	Acid lact.	% act.	Acid lact.	% act.	Acid lact.	% act.	Acid lact.	% act.
Fără	12,46	100	13,25	100	15,28	100	25,97	100
Adenozina	18,47	149	18,47	139	17,84	119	41,51	160

* — aerobioză; ** — anaerobioză.

Mediul de incubare şi condiţiile de lucru sînt indicate în tabela 1. Adenozina adăugată, la volum final de 3 ml, este în concentraţie de 5 mM. Rezultatele se dau în micromoli acid lactic, format în 60 min/g de proteină la 35° C, şi exprimă media unui număr de cinci experienţe.

Din datele noastre (tabela 1) rezultă că nucleele de ficat de şobolan, preparate în condiţiile noastre de lucru, îşi păstrează enzimele şi substratele necesare glicolizei, în absenţa substratelor exogene rezultînd aproximativ 7 μmoli de acid lactic/oră/g de proteină în aerobioză, respectiv 14 μmoli de acid lactic/oră/g de proteină în anaerobioză. În prezenţa glucozei, producerea de acid lactic se dublează (aproximativ 13 μmoli de acid lactic/oră/g de proteină în aerobioză, respectiv 28 μmoli de acid lactic/oră/g de proteină în anaerobioză). Stimularea puternică a glicolizei de către glucozo-6-fosfat (aproximativ 17 μmoli de acid lactic/oră/g de proteină în aerobioză şi 36 μmoli de acid lactic/oră/g de proteină în anaerobioză) demonstrează că etapa limitantă de viteză este fosforilarea substratului.

Tabela 4

Influența unor inhibitori asupra glicolizei nucleare

Adaos	Substrat				
	S_{la}	Fr. 1,6-PP	riboză	glucoză	Gl. 6-P
Fără	24,06	41,73	5,40	35,96	46,95
ADN-ază	14,70 *	0,00	0,00	0,00	0,00
NaF	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

S-a lucrat în anaerobioză. Mediul de incubare și condițiile de lucru sînt indicate în tabela 1. S-a adăugat 2,5 mg de ADN-ază/probă, iar la experiența * 1 mg de ADN-ază/probă, NaF conc. finală de 7 mM.

Rezultatele se exprimă în micromoli de acid lactic, formați în 60 min/g proteină la 35°C, și reprezintă media a patru experiențe.

Faptul că formarea de acid lactic este inhibată în prezența oxigenului, conform rezultatelor din tabela 1, arată că și la nivel nuclear are loc cunoscutul efect Pasteur, de competiție pentru cofactori între glicoliză și respirație. Acesta constituie un argument în plus în favoarea existenței respirației la nivel nuclear. Consumul de acid lactic înregistrat în condiții aerobe (o cantitate de acid lactic sub valoarea martorului și a probei incubate anaerob) pledează pentru o utilizare a acidului lactic ca metabolit în procesele oxidative (studii în curs).

Diferența de comportament dintre SCD și S_{la} (SCD delipidat) dovedește că lipidele sînt un inhibitor specific al glicolizei nucleare (studii în curs urmăresc fenomenul la nivel citoplasmatic).

O dovadă concludentă a faptului că procesul de glicoliză studiat este de natură strict nucleară o prezintă experiențele noastre cu ADN-ază, un binecunoscut inhibitor al diferitelor procese nucleare, al cărei mecanism de acțiune este încă discutat. ADN-aza adăugată de noi în mediul de incubare al nucleelor produce o inhibiție de 100% a producției de lactat.

Faptul că nici NAD, nici ATP adăugate mediului de incubare al suspensiei nucleare nu influențează procesul glicolitic nuclear, spre deosebire de efectul lor asupra glicolizei citoplasmatice, ne face să presupunem că în spațiul intranuclear acești efectori se găsesc într-o concentrație suficientă pentru a nu mai necesita un aport exogen.

Participarea adenozinei la stimularea glicolizei nucleare se poate datori fie participării ei ca precursor al nucleotidelor adenilice, fie faptului că este o sursă de riboză. Lipsa oricărui efect al ribozei, înregistrată și pe nucleele de timus [11], poate fi consecința impermeabilității nucleului pentru riboză, forma ei de pătrundere în nucleu fiind molecula de adenozină.

Cantitatea de ATP, calculată în experiențele noastre în condiții de anaerobioză, se situează între 15 μmoli de ATP/oră/g de proteină cu substrat endogen și 116,46 μmoli de ATP/oră/g de proteină în prezența de fructozo-1,6-difosfat. Necesarul de ATP calculat de Siebert [2] pentru diferite sinteze sau fenomene de transport este în nucleele hepatice de 25—30 μmoli de ATP/oră/g de greutate uscată. Cu alte cuvinte, în prezența unui aport suficient de substrate, fenomenele de glicoliză ar putea

furniza întreaga energie necesară nucleului. Rămîne încă neclarificată problema rolului enzimelor respiratorii, a căror prezenţă în membrana nucleară pare astăzi a fi dovedită [12]—[14].

CONCLUZII

Inhibiţia glicolizei de către ADN-ază dovedeşte specificitatea procesului studiat.

Esterii fosforici ai hexozelor sînt stimulatori puternici ai glicolizei, fosforilarea glucozei fiind etapa limitantă. Riboza este fără efect asupra glicolizei nucleare; în schimb, adenozina creşte producerea de lactat, rolul limitant în metabolizarea ribozei fiind transferul ei în nucleu.

SCD este un inhibitor al glicolizei nucleare datorită conţinutului său în lipide, respectiv acizi graşi; în schimb, S_{1a} (SCD delipidat) constituie un substrat pentru glicoliză.

NAD şi ATP, adăugaţi mediului de incubare al nucleelor, nu modifică producerea de lactat.

Prezentat la redacţie la 13 decembrie 1971

Institutul de medicină şi farmacie Cluj,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. G. Siebert, Exptl. Cell. Res. (Suppl.), **9**, 389 (1965).
2. G. Siebert, *The cell. nucleus. Metabolism and radiosensitivity*, Proc. Symp. Radiobiol. Inst. NTO, 1966, p. 266.
3. V. G. Allfrey, Exptl. Cell. Res. (Suppl.), **9**, 183 (1963).
4. B. S. McEwen, V. G. Allfrey, A. E. Mirsky, J. Biol. Chem., **238**, 758 (1963).
5. A. W. T. Konings, Biochim. Biophys. Acta, **189**, 125 (1969).
6. I. Manta, I. Bodea, R. Tilinca, Rev. roum. Biochim., **7**, 169 (1970).
7. I. Manta, R. Pop, I. Bodea, L. Mureşan, O. Bârzu, V. Botez, Rev. roum. Biochim., **4**, 253 (1967).
8. S. B. Barker, în *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Colowick şi N. O. Kaplan, vol. III, New York, Acad. Press, 1957, p. 241.
9. O. H. Lowry, N. I. Rosebrough, A. L. Farr, R. I. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
10. R. Penniall, J. P. Holbroock, N. C. Davidian, J. B. Griffin, *The cell. nucleus. Metabolism and radiosensitivity*, Proc. Symp. Radiobiol. Inst. NTO, 1966.
11. A. W. T. Konings, Biochim. Biophys. Acta, **223**, 398 (1970).
12. I. B. Zbarsky, K. A. Perevoscikova, L. N. Delectorskaia, V. V. Delectorski, Nature, **221**, 257 (1969).
13. I. B. Zbarsky, A. A. Pokrovski, K. A. Perevoscicova, L. N. Delectorskaia, N. V. Lesneva, Dokl. AN SSSR, **181**, 993 (1968).
14. T. Ueda, T. Matsuura, N. Date, Biochem. Biophys. Res. Commun., **34**, 332 (1969).

ROLE OF THE CELLULAR NUCLEUS IN ENERGOGENESIS
IV. PECULIARITIES OF THE GLYCOLYSIS IN RAT LIVER NUCLEI

SUMMARY

The aerobic and anaerobic glycolysis of rat liver nuclei with various substrates and cofactors is investigated. The isolated nuclei display an important glycolytic activity towards endogenous substrates. Among the exogenous substrates (glucose, glucose-6-phosphate, fructose 1,6-diphosphate phosphoenolpyruvate and S_{1a}^{-}) the maximum yield is given by fructose-1,6-diphosphate. Nuclear glycolysis is inhibited by SCD. Purinic nucleosides activate the glycolysis, white ATP or NAD do not influence the formation of lactic acid. The DNA ase as well as NaF inhibit the formation of lactic acid in the nuclei. The obtained results were use for estimating the capacity of rat liver nuclei to synthesize ATP by glycolysis.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 251–253 (1972)

VARIAȚIA SPECTRULUI IZOPEROXIDAZELOR ÎN TIMPUL PERIOADEI DE IERNARE ÎN RĂDĂCINA ȘI FRUNZA DE GRÎU

I. BRAD, ZOIȚA MARCU, ELENA MOLDOVEANU, ECATERINA DOBRESCU și C. MILICĂ

Rezumat.—Analizînd variația spectrului izoenzimelor peroxidazice în timpul perioadei de iernare (1967–1968) în rădăcinile și frunzele de grîu (faza de două frunze), se constată creșterea intensității globale a peroxidazei și creșterea numărului de fracțiuni izoperoxidazice.
Crește în special numărul fracțiunilor care migrează înspre polul negativ, părînd a fi o consecință a acțiunii nocive a gerului.

Cercetările noastre referitoare la variația spectrelor izoenzimelor au dus la constatarea că există diferențieri determinate de caracteristica de soi sau de specie, de faza de vegetație și de unii factori biotici sau abiotici de mediu [1]–[3].

În legătură cu cele enunțate mai sus, citäm lucrările lui Chu [4], Upadhya [17], Jaoska [8], Tsai și Nelson [16], Hart și Bathia [7], Kawasima, Iwai și Tamaki [10]. Unele cercetări s-au referit și la alte aspecte, ca: influența iradierii semințelor asupra izoperoxidazelor din frunze — Giacomelli [6] — sau inducerea unor modificări, precum și a sintezei izoamilazelor cu ajutorul acidului giberelic — Momotani și Koto [14]. În raport direct cu problema analizată de noi, citäm lucrările lui Gerloff, Stahmann și Smith [5], care, analizînd rădăcinile la lucernă, găsesc modificări mici în comportarea electroforetică a proteinelor, dar constată apariția a două izoperoxidaze noi după călire. Roberts [15] crește plante de grîu la 6 și 20°C și, analizînd frunzele, găsește unele diferențieri mai ales cantitative între izoperoxidaze. Autorul leagă modificările constatate de procesul de călire.

Anterior noi am cercetat variația activității peroxidazei în timpul iernii în funcție de rezistența diferitelor specii și soiuri [2]. Diferențierile constatate de noi în ceea ce privește spectrul și calitatea izocatalazelor în funcție de rezistența la ger a diferitelor specii [1]–[3] ne-au dus la concluzia că este posibilă și o variație a spectrului izoperoxidazelor în funcție de variația condițiilor de temperatură în timpul iernării.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-au luat în studiu următoarele soiuri: *Lutescens*, *Beloțerkovskaia Bezostaia*, *București*, *San Pastore* și *Capega*, bine diferențiate din punctul de vedere al rezistenței la ger [13]. Semințele au fost semănate în vase

mici de vegetaţie; plantele răsărite au intrat în perioada de iernare în faza de două frunze [12]. Ele au fost recoltate la date diferite (specificate în tabela rezultatelor), care corespund unor perioade diferite de expunere a plantelor la temperaturi scăzute [11]. Probele medii de frunze şi de rădăcini mărunţite s-au majorat cu de două ori v/g de tampon medinal — HCl (pH = 8,6). După extragere la rece pînă a doua zi, s-a luat un volum din supernatantul extractului centrifugat, care s-a amestecat cu un volum egal de soluţie agar 1,25% în tampon veronal diluat 1/3. Amestecul a fost introdus în locaşul de pe placa de electroforeză. S-a lucrat pe gel de agar 1,25% în soluţie tampon veronal diluat 1/3, pH = 8,6. Electroforeza a fost executată la 220 V 1,2 mA/cm timp de 4 ore, plăcile avînd dimensiunile de 17/3,5 cm. După acest interval, plăcile au fost introduse într-o soluţie constituită dintr-un amestec în volume egale de apă oxigenată 1%, benzidină 0,093%, ambele în tampon acetat pH = 4,7 şi acelaşi volum de tampon acetat pH = 4,7 (v/v/v). După 8—10′, plăcile s-au scos, s-au spălat cu apă distilată şi s-au acoperit cu hîrtie de filtru umezită în apă distilată şi s-au lăsat pînă s-au uscat. După uscare, plăcile s-au densitometrat şi s-au fotografiat. În acest interval de timp, benzile albastre se transformă în benzi brune, cele mai slabe scăpînd astfel aparatului fotografic sau unor densitometre. Specificăm faptul că pentru expunerea şi interpretarea rezultatelor vom utiliza noţiunile de fracţiuni plus (+) şi minus (—) pentru fracţiunile care se deplasează către anod, respectiv către catod în raport cu startul. De asemenea, fracţiunile au fost numerotate cu +1, +2, respectiv cu —1, —2, începînd de la start.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analizînd electroforegramele din punctul de vedere al numărului de fracţiuni izoperoxidazice, am constatat că numărul de fracţiuni creşte direct proporţional cu timpul de expunere la temperaturi scăzute atît la frunze, cît şi la rădăcini. Creşterea numărului de fracţiuni izoperoxidazice este mai evidentă la fracţiunile notate de noi în mod arbitrar cu semnul minus. Analiza zimogramelor arată, de asemenea, că fracţiunile izoperoxidazice sînt bine individualizate la sfîrşitul perioadei de călire, demonstrîndu-se prin aceasta că izoenzimele peroxidazice, în această perioadă, au căpătat particularităţi care le diferenţiază din punct de vedere electric şi structural, individualizîndu-se mai bine.

Este adevărat că nu se poate afirma cu siguranţă dacă este vorba de proteine sintetizate *de novo*, sau de proteine rezultate din ruperea sau din recombinarea moleculei proteice, ori din combinarea cu substanţe cu moleculă mai simplă care să le modifice caracteristicile biofizice şi biochimice.

Din cercetările făcute de noi s-ar putea deduce că fracţiunile notate de noi cu minus, deci cele ce se găsesc înspre polul negativ, luînd ca punct neutru iniţial startul, sînt mai stabile faţă de scăderea temperaturii şi la nivelul lor se pot distinge unele diferenţe între soiurile rezistente şi nerezistente la ger.

Prin analogie cu noţiunea cunoscută de enzimă adaptativă, s-ar părea că cercetările noastre permit formularea noţiunii de izoenzimă adaptativă, care apare în urma unor condiţii deosebite de mediu.

CONCLUZII

Analizînd zimogramele obţinute în cele 6 date de expunere la temperaturi scăzute, am constatat că numărul de fracţiuni izoperoxidazice creşte în raport direct cu durata expunerii la temperaturi scăzute atît la extractele provenite din frunze, cît şi la cele provenite din rădăcini.

În cercetările viitoare ne propunem să studiem izoperoxidazele la plante într-o fază de 3—5 frunze, în care diferenţa dintre soiuri e mai evidentă, pentru a putea vedea dacă spectrul izoperoxidazic poate constitui un criteriu de triere după rezistenţă.

Prezentat la redacţie la 11 iunie 1971

I.C.C.P.T.
Secţia de chimie şi fiziologie

BIBLIOGRAFIE

1. Brad I., Zoiţa Marcu, Elena Moldoveanu, Niculescu St., St. cerc. biochim., **12**, 129 (1967).
2. Brad I., St. cerc. biochim., **9**, 11 (1966).
3. Brad I., St. cerc. biochim., **8**, 293 (1965).
4. Chu Y., Japan. J. Genet., **42**, 233 (1967).
5. Gerloff E. D., M. A. Stahmann, D. Smith, Pl. Physiol., **42**, 895 (1967).
6. Giacomelli M., Nature, **213**, 5082, 1265 (1967).
7. Hart G. E., C. R. Bathia, Canad. J. Genet. Cystol., **4**, 367 (1967).
8. Jaoska V., Izv. Akad. Nauk Est on Serv. Biol., **17**, 164 (1968).
9. Johanson H., Hereditas genet. arkiv., **57**, 440 (1967).
10. Kawasima N., A. Iwai, E. Tamaki, Plant cell. physiol., **8**, 447 (1967).
11. Koch H. D., *Zur Methodik des künstlichen Gefrierversuches als Hilfsmittel für die Züchtung winterfester Getreidesorten*, Bernburg Halle Diplom. Landw., 1959.
12. Kuperman F. M., *Biologhiceskie osnovî kulturî pseniţi*, Moskva, Izd. Moskovskogo Universiteta, 1956.
13. Milică C., N. Eustaţiu, Probl. agricole, **1**, 18 (1969).
14. Momotani Y., J. Koto, Pl. Physiol., **41**, 1395 (1966).
15. Roberts D. W., Pl. Physiol., **42**, 5 (1967).
16. Tsai P. Y., O. E. Nelson, Pl. Physiol., **43**, 103 (1968).
17. Upadhya M. H., J. Yee, Phytochemistry, **7**, 6 (1968).
18. Wilkinson J. H., *Izoenzymes*, ed. E. & F. N. Span, Ltd., Londra, 1965.

THE VARIATION OF ISOPEROXIDASE PATTERN IN THE WEAT ROOT AND LEAF, DURING HIBERNATION

SUMMARY

An increase of total peroxidase activity and peroxidase fractions from extracts of wheat roots and leaves (2-leave state) during winter (1967—1968), was observed. This increase is especially due to the cathodic peroxidase isoenzymes which appear to be most resistant to cold.

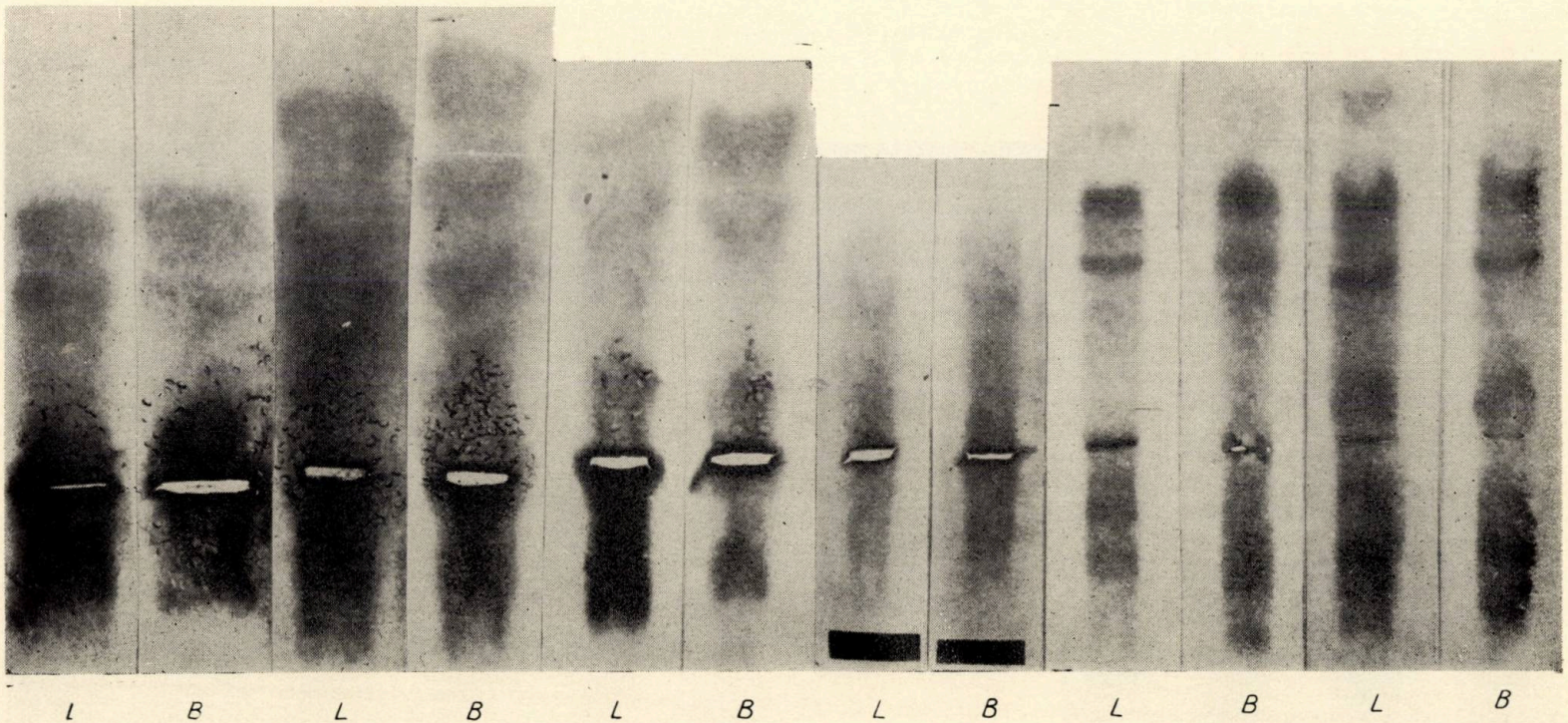


Fig. 1. — Variația spectrului izoperoxidazic în frunze la soiurile *Lutescens* (L) și *București* (B) în timpul iernii, la datele de 28.XI, 4.XII, 17.I, 14.II, 18.III și 27.III.

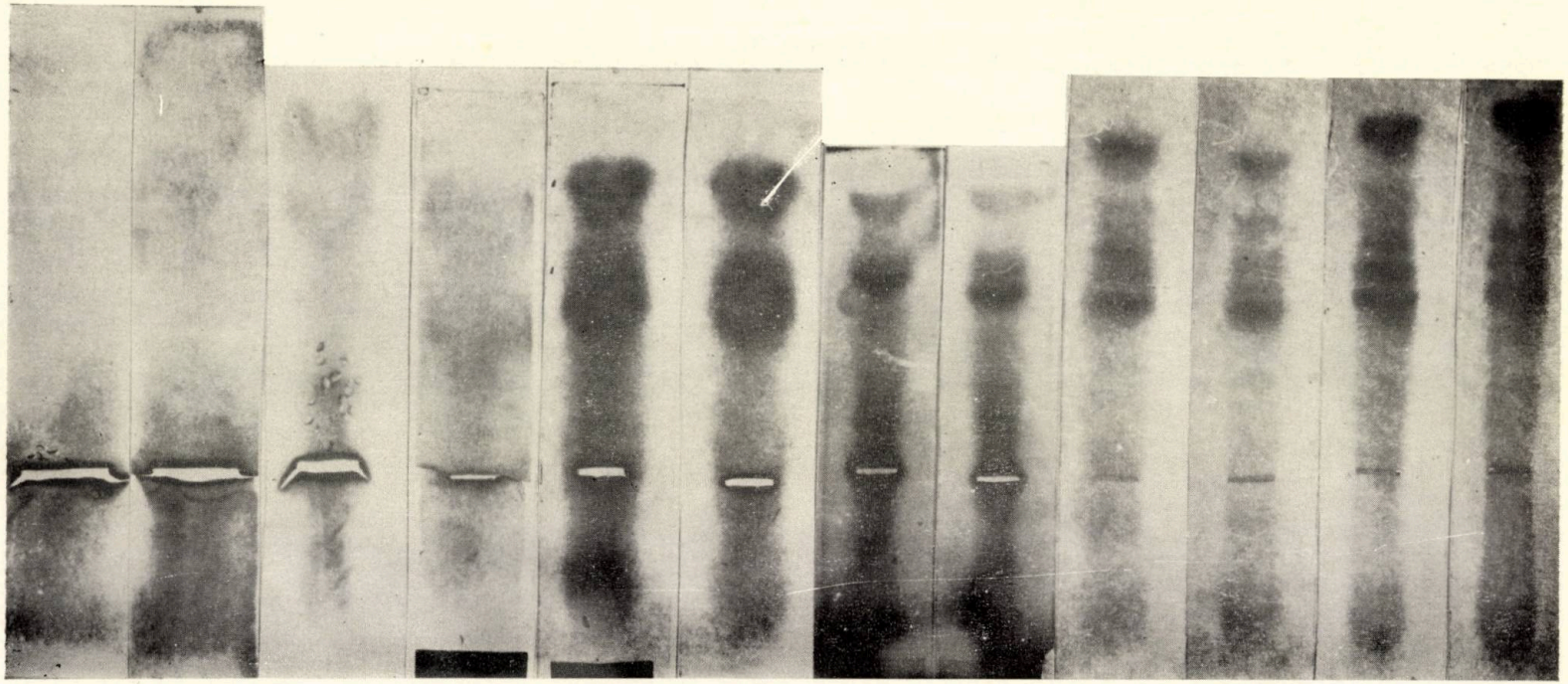


Fig. 2. — Variația spectrului izoperoxidazic în rădăcini la soiurile *Lutescens* (L) și *București* (B) în timpul iernii, la datele de 28.XI, 4.XII, 17.I, 14.II, 18.III și 27.III.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 255–261 (1972)

IZOENZIMELE PIROFOSFATAZEI ANORGANICE DIN ȚESUTURI ANIMALE

ELENA HADARAG

Rezumat.—Se cercetează polimorfismul pirofosfatazei tisulare cu ajutorul cromatografiei pe coloană. Experiențele s-au făcut pe cord, creier, ficat, mușchi scheletici, rinichi și splină de iepure și de cobai, utilizînd Sephadex G-200. Rezultatele au arătat că pirofosfataza anorganică din țesuturile menționate este alcătuită din mai multe fracțiuni izoenzimice, cuprinse între 3 și 6.
Numărul fracțiunilor variază cu specia și cu organul. S-au remarcat de asemenea diferențe în ceea ce privește activitatea enzimatică a fracțiunilor separate. Se corelează existența numărului mare de fracțiuni ale pirofosfatazei cu rolul acestei enzime în menținerea unor echilibre metabolice specifice.

Dinamica grupării pirofosfatice, foarte frecvent întîlnită în procesele din materia vie, are o dinamică strîns corelată cu activitatea pirofosfatazei anorganice din țesuturi. Această enzimă prezintă o deosebită importanță biologică, deoarece intervine în reglarea a numeroase reacții metabolice la care participă fragmentul pirofosforic.

Se știe că coordonarea proceselor biologice la nivel molecular este asigurată în mare măsură de existența izoenzimelor proteinelor active. Ele pot interveni ca factori de control, orientînd metabolismul către o anumită cale în conformitate cu necesitățile fiziologice ale organismului.

Pe baza acestor considerente și cu scopul de a stabili unele particularități ale pirofosfatazei din țesuturi, ne-am propus a cerceta structura ei izoenzimatică. Formele moleculare multiple ale pirofosfatazei și posibilitățile de separare au fost puțin studiate, iar informațiile existente în literatura de specialitate sînt reduse.

Primele date referitoare la purificarea și la fracționarea pirofosfatazei au fost publicate de Schito și Pesce [8], care au separat-o din bacterii prin gel-filtrare pe Sephadex G-25. Meloni și Pesce [6] au izolat două fracțiuni ale pirofosfatazei din *E. coli* cu ajutorul DEAE-celulozei. În continuare, Schito și Pesce [9] au purificat-o din *E. coli* prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu și apoi prin filtrare pe DEAE-celuloză. Hruška [3] a separat electroforetic pirofosfataza din plasma seminală de iepure. Pentru purificarea pirofosfatazei din extractele microsomiale de ficat de șoarece, Haruki Ogawa și colab. [2] au recurs la filtrarea pe hidroxi-apatită și apoi pe DEAE-Sephadex. Recent, Hruška [4] a separat pirofosfataza din sperma de vier prin gel-filtrare pe Sephadex G-200.

Existența formelor moleculare multiple și aspectul enzimogramei pirofosfatazei anorganice alcaline din țesuturi de origine animală nu au făcut încă obiectul vreunei cercetări, de aceea în cele ce urmează vom reda rezultatele obținute cu privire la polimorfismul acestei enzime.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările au fost făcute pe cord, creier, ficat, mușchi scheletici, rinichi și splină de iepure și de cobai. Pentru obținerea soluției enzimatice s-au prelevat organele imediat după sacrificare de la animale adulte, clinic sănătoase. După triturare s-a omogenizat la rece în proporție de 1/10 greutate/volum, cu o soluție salină tampon Tris-HCl cu pH = 7,2. Îndepărtarea resturilor celulare și obținerea extractului citoplasmatic, care a servit ca sursă de enzimă, s-a făcut prin centrifugare la rece cu 5 000rot/min și apoi cu 10 000 rot/min. Un volum de 10 ml de soluție enzimatică s-a trecut printr-o coloană cromatografică de dimensiuni 1,8/20 cm umplută cu gel de Sephadex G-200, care s-a dovedit cel mai indicat în acest caz. Coloana a fost echilibrată tot cu tampon Tris-HCl cu pH = 7,2. După filtrare s-a eluat în gradient constant, cu aceeași soluție-tampon, pînă la completa desorbție a proteinei, colectîndu-se 24 de porțiuni a cîte 3 ml. În fiecare porțiune s-au dozat proteinele cu reacția Folin după tehnica lui Miller [7] și activitatea enzimatică folosind o tehnică descrisă anterior [1]. Aprecierea activității s-a făcut în unități pirofosfatazice (U.P-P-ază/g proteină), care reprezintă numărul de mg de fosfat eliberat în timp de o oră la 37° de 1 g de proteină activă. Cu datele obținute am trasat enzimogramele și proteinogramele respective.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Curbele de eluție rezultate arată că pirofosfataza anorganică din țesuturile menționate este alcătuită din mai multe fracțiuni. Numărul lor variază cu specia și cu organul. Pentru exemplificare prezentăm mai jos enzimogramele pirofosfatazei în cazul celor două specii (iepure și cobai).

Figurile 1 *a*—4*a* arată că pirofosfataza din diferitele organe de iepure este alcătuită în majoritate din 6 izoenzime; excepție fac rinichii și splina, care conțin 5 și, respectiv, 4 fracțiuni (fig. 5*a* și 6*a*). La cobai, numărul izoenzimelor este, în general, mai scăzut, maximul fiind în ficat (5 fracțiuni), iar în restul organelor oscilînd între 3 și 4 (fig. 1*b*—6*b*).

De asemenea se remarcă diferențe în ceea ce privește activitatea enzimatică a fracțiunilor separate. Astfel, la iepure, în cord și în mușchii scheletici (fig. 1*a* și 4*a*), cea mai mare activitate au prezentat-o fracțiunile cu greutate moleculară mare. Pirofosfataza cerebrală, renală și din splină (fig. 2*a*, 5*a* și 6*a*) a avut o activitate mare în fracțiunile cu greutate moleculară medie, iar la pirofosfataza hepatică (fig. 3*a*) fracțiunea cu molecula mică a fost cea mai activă.

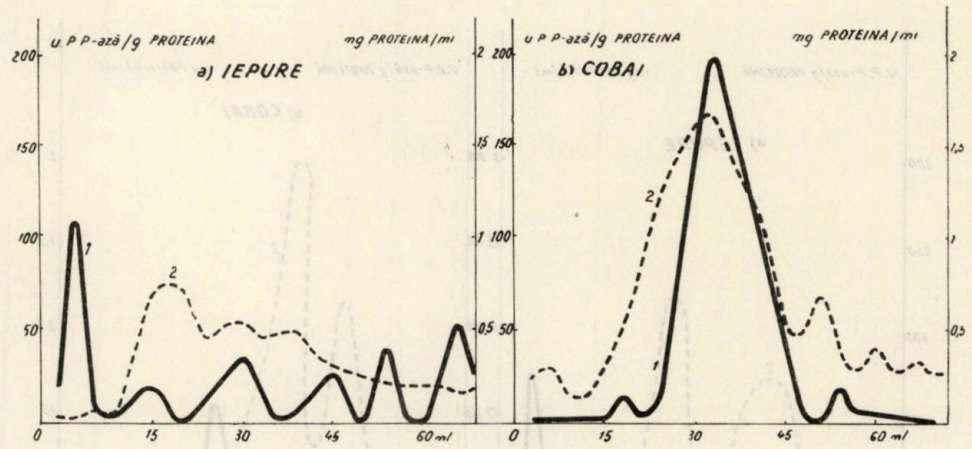


Fig. 1. — Pirofosfataza din cord de iepure și cobai.
1 — enzimograma ; 2 — proteinograma.

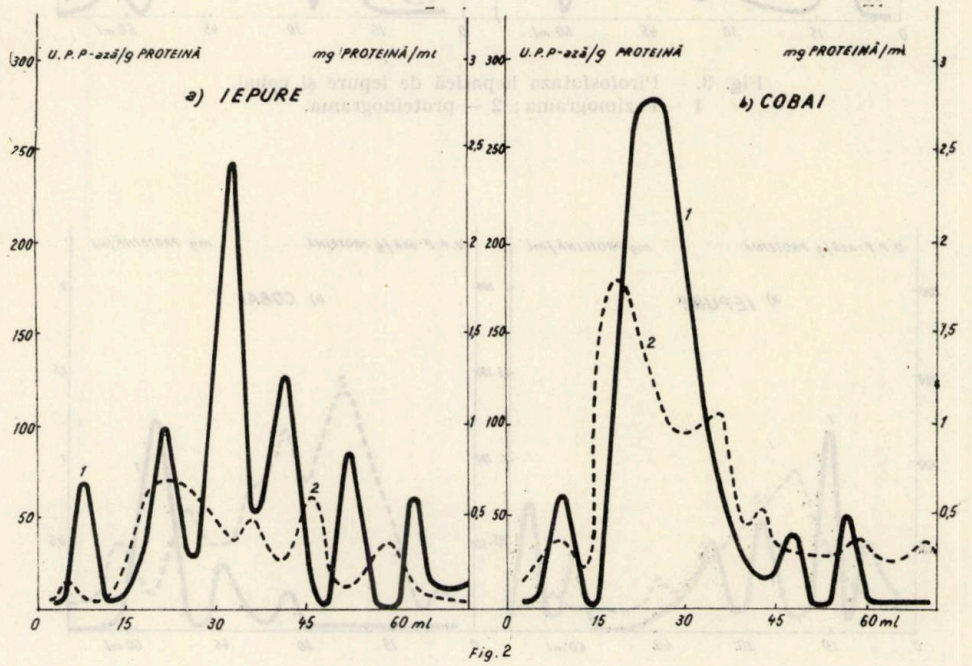


Fig. 2. — Pirofosfataza cerebrală de iepure și cobai.
1 — enzimograma ; 2 — proteinograma.

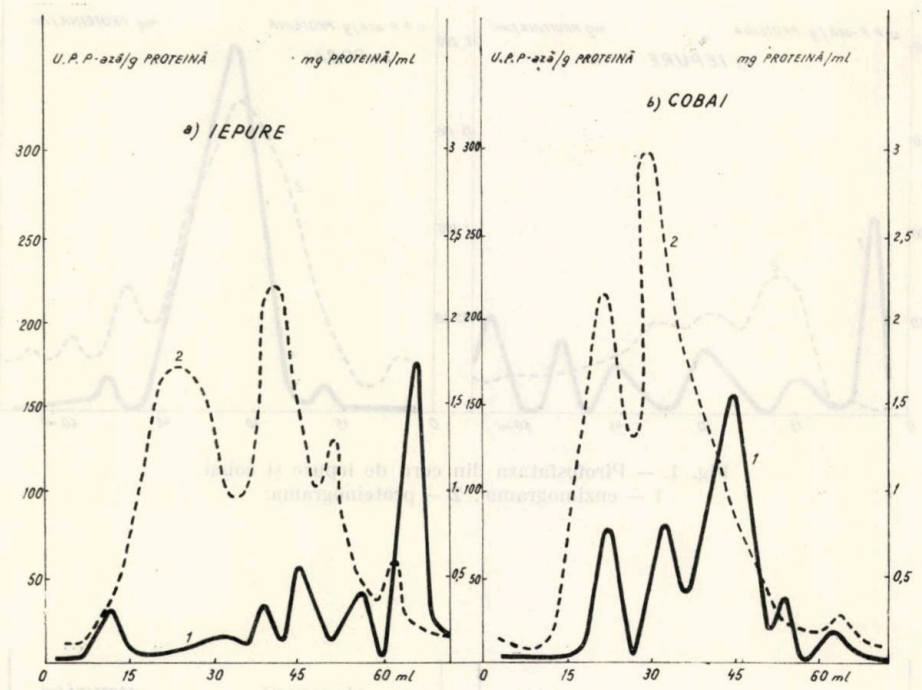


Fig. 3. — Pirofosfataza hepatică de iepure şi cobai.
1 — enzimograma ; 2 — proteinograma.

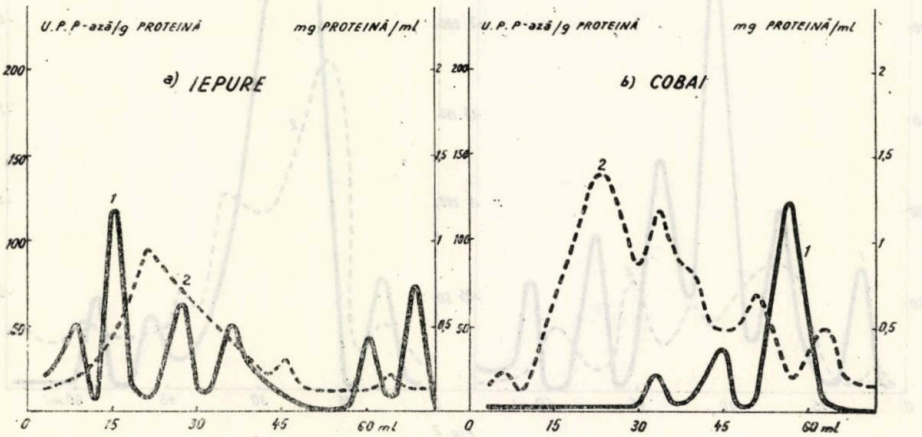


Fig. 4. — Pirofosfataza musculară de iepure şi cobai.
1 — enzimograma ; 2 — proteinograma.

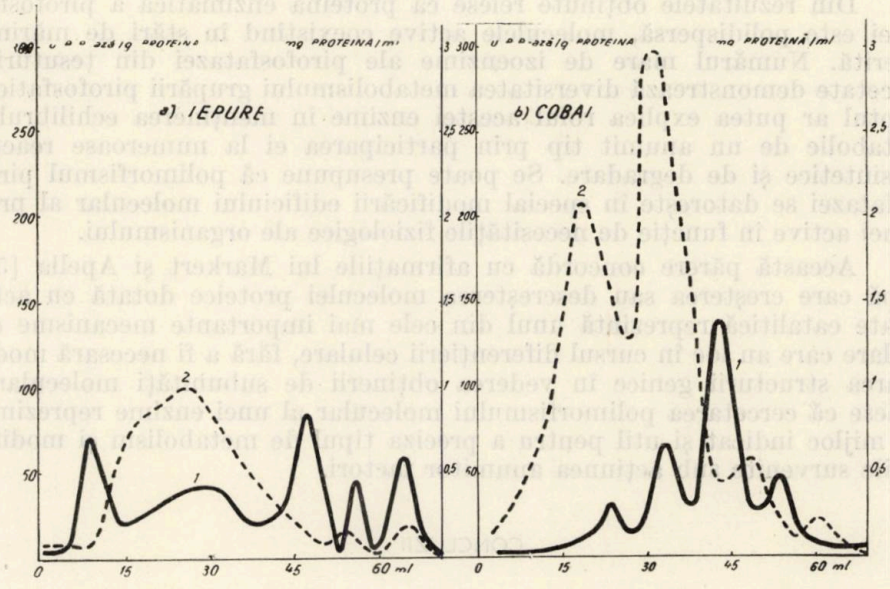


Fig. 5. — Pirofosfataza renală de iepure și cobai.
1 — enzimograma ; 2 — proteinograma.

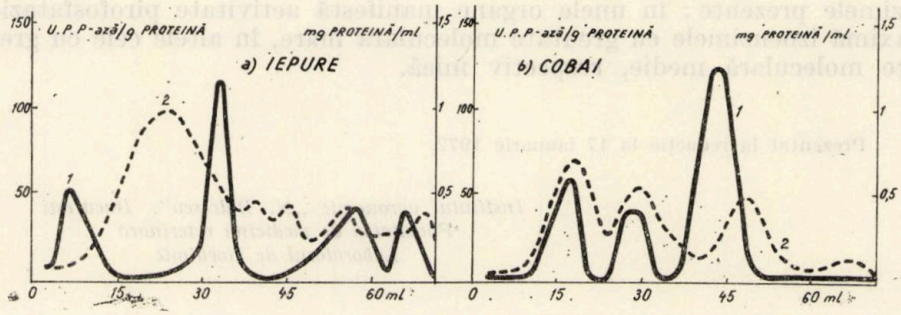


Fig. 6. — Pirofosfataza din splină de iepure și cobai.
1 — enzimograma ; 2 — proteinograma.

Spre deosebire de iepure, la cobai în toate organele cercetate (fig. 1*b*—5*b*), exceptînd splina, a avut activitate maximă fracţiunea cu greutate moleculară medie. În cazul splinei (fig. 6*b*), cea mai activă a fost fracţiunea cu greutate moleculară mică.

Din rezultatele obţinute reiese că proteina enzimatică a pirofosfatazei este polidispersă, moleculele active coexistînd în stări de mărime diferită. Numărul mare de izoenzime ale pirofosfatazei din ţesuturile cercetate demonstrează diversitatea metabolismului grupării pirofosfatice. Faptul ar putea explica rolul acestei enzime în menţinerea echilibrului metabolic de un anumit tip prin participarea ei la numeroase reacţii biosintetice şi de degradare. Se poate presupune că polimorfismul pirofosfatazei se datoreşte în special modificării edificiului molecular al proteinei active în funcţie de necesităţile fiziologice ale organismului.

Această părere concordă cu afirmaţiile lui Markert şi Apella [5], după care creşterea sau descreşterea moleculei proteice dotată cu activitate catalitică reprezintă unul din cele mai importante mecanisme de reglare care au loc în cursul diferenţierii celulare, fără a fi necesară modificarea structurii genice în vederea obţinerii de subunităţi moleculare. Reiese că cercetarea polimorfismului molecular al unei enzime reprezintă un mijloc indicat şi util pentru a preciza tipul de metabolism şi modificările survenite sub acţiunea anumitor factori.

CONCLUZII

1. Pirofosfataza anorganică este alcătuită din mai multe fracţiuni active inegale din punctul de vedere al greutăţii moleculare şi al activităţii enzimatice.

2. Numărul fracţiunilor separate variază cu specia şi cu organul.

3. Se remarcă deosebiri de la specie la specie şi de la organ la organ şi în ceea ce priveşte greutatea moleculară a celor mai active dintre izoenzimele prezente : în unele organe manifestă activitate pirofosfatazică maximă izoenzimele cu greutate moleculară mare, în altele cele cu greutate moleculară medie, respectiv mică.

Prezentat la redacţie la 17 ianuarie 1972.

Institutul agronomic „N. Bălcescu", Bucureşti
Facultatea de medicină veterinară
Laboratorul de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. Buruiană L. M., Elena Hadarag, Rev. roum. Biochimie, **5**, 177 (1968).
2. Haruki Ogawa, Mikio Savada, Minorn Kawada, J. Biochem. (Tokio) **59**, 126 (1966), citat după Chemical Abstracts, **64**, 17 930 (1966).
3. Hruška K., Sb. Vysoke Scoly Zemedel Brno Rada, **13**, 103 (1965).
4. Hruška K., FEBS Symposium, **18**, 241 (1970).
5. Markert C. L., E. Appella, Annals of the New York Academy of Sciences, **94**, 678 (1961)

6. MELONI G. A., A. PESCE, G. G. SCHITO, Giorn. Microbiol., **13**, 159 (1965).
7. MILLER G. L., Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
8. SCHITO G. G., A. PESCE, Giorn. Microbiol., **13**, 31 (1965).
9. SCHITO G. G., A. PESCE, Giorn. Microbiol., **13**, 145 (1965).

INORGANIC PYROPHOSPHATASE ISOENZYMES IN THE MAMMALIAN TISSUES

SUMMARY

The polymorphism of tissue pyrophosphatase is determined. By means of column chromatography on Sephadex G-200 are analyzed the extracts of brain, heart, kidney, liver, skeletal muscles and spleen of rabbit and guinea pig. Results showed that the pyrophosphatase from these organs is polymorphic, the number of isoenzymes oscillating between 3—6.

The number of isoenzymes and their activity vary with the species and organs. The high number of isoenzymes is correlated with the role of pyrophosphatase in the maintenance of metabolic equilibrium in tissues.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 263–269 (1972)

COMPUȘII FOSFATICI ȘI ACTIVITATEA FOSFOMONOESTERAZELOR DIN ERITROCITE LA PĂSTRĂVUL-CURCUBEU (*SALMO GAIRDNERI*) ÎN INSUFICIENȚA VITAMINELOR B

VALENTINA JURCĂ și DUMITRU MATEI

Rezumat. — Sînt prezentate modificările induse de deficitul de vitamine B din hrana artificială a salmonidelor (*Salmo gairdneri*) asupra compușilor fosfatici și a activității fosfomonoesterazelor eritrocitare : valorile fosforului anorganic, fosforului acidosolubil, fosforului ușor hidrolizabil, fosforului proteic, fosforului lecitinic și ale activității fosfomonoesterazelor (cu optimul de pH = 9,2 și 5,4) sînt semnificativ mai scăzute la păstrăvii cărora li s-a administrat hrană fără adaos de vitamine B comparativ cu ale martorului, a cărui hrană a conținut 8% drojdie de bere ca sursă de vitamine B.

Problema vitaminelor fiind privită astăzi, atît din punct de vedere teoretic, cît și practic, ca o parte a problemei generale a moleculelor organice de aport strict exogen, datele din literatură arată că insuficiența aportului acestora este cauza perturbărilor care se produc în metabolismul substanțelor, în procesele fiziologice și în funcțiile biologice ale organismului.

În salmonicultură, hrana peștilor fiind preparată aproape exclusiv de om, acest fapt și calitățile chimice necorespunzătoare ale apei pot facilita apariția carențelor vitaminice [1], cu urmări mai mult sau mai puțin grave pentru organismul peștilor.

Cercetările cu privire la vitaminele B la animalele cu sînge rece sînt deocamdată puține, axîndu-se în special pe stabilirea conținutului lor în organe și în țesuturi [2]–[4] la diferite specii de pești și pe efectele produse de prezența sau de lipsa unor vitamine din hrană asupra creșterii și dezvoltării peștilor [5]–[12]. Takamatsu și colab. [10], folosind ca hrană pentru păstrăvii mici ficatul proaspăt, au ajuns la concluzia că stimularea creșterii lor s-ar datori diferitelor sisteme enzimatice dependente de vitamine. După unele cercetări [13], prezența vitaminelor în hrana artificială a păstrăvilor este absolut necesară, dar în ceea ce privește minimul necesar în vederea desfășurării în condiții normale a proceselor metabolice există păreri diferite. Cercetările întreprinse de Halver [6] cu privire la necesarul de vitamine în hrana salmonidelor au arătat că în deficit de vitamine hidrosolubile apar simptome caracteristice care dispar la administrarea vitaminelor respective, cu excepția riboflavinei, a cărei carență provoacă simptome ireversibile, ajungîndu-se la orbirea peștelui,

după care survine moartea. Drabkina, citată de [14], a arătat că, pe lîngă condiţiile ecologice, felul alimentaţiei şi compoziţia hranei se reflectă asupra tabloului sanguin la peşti.

Fosforul, jucînd un rol de prim ordin, alături de calciu, în creşterea şi în dezvoltarea scheletului peştilor, a constituit obiectul cercetărilor noastre [15]—[17]. Într-o lucrare anterioară [15] s-a arătat variaţia compuşilor fosfatici în funcţie de natura şi de compoziţia hranei administrate, însă nu s-a putut preciza dacă unul dintre factorii care au influenţat negativ metabolismul fosforat a fost aportul insuficient de vitamine B, încît ne-am propus să lămurim acest punct în lucrarea de faţă.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost organizate în bazinele experimentale la Baza salmonicolă Tarcău pe păstrăvi în vîrstă de 2 ani, (P_2^+), în condiţii hidrochimice optime, asemănătoare cu cele citate într-o lucrare anterioară [18]. S-au constituit două loturi cu cîte un efectiv de 500 de păstrăvi. Hrana administrată ambelor loturi a constituit-o reţeta RT_4, la care nu s-a mai adăugat sare de molibden şi a cărei compoziţie este dată într-o lucrare precedentă [18].

Hrana lotului martor conţinea 8% drojdie de bere ca sursă de vitamine B, iar cea a lotului experimental, în locul drojdiei de bere, cuprindea făină de gozură în cantitate echivalentă. Vitaminele liposolubile, vitamina C, unele cantităţi de vitamine B şi sărurile minerale au fost asigurate de însăşi componenţa reţetei furajere. Modul de administrare a hranei a fost similar celui anterior [18]. Data începerii experienţei a fost 10 iulie. Pe întreaga perioadă experimentală, temperatura apei a fost zilnic înregistrată, fiind în medie 17,5°C.

S-a determinat în eritrocite: fosforul anorganic, fosforul acidosolubil, fosforul uşor hidrolizabil de 7 min, fosforul proteic şi fosforul lecitinic. Extragerea şi fracţionarea lor s-au făcut după metodele indicate de Travina [19].

Paralel cu compuşii fosfatici s-a determinat şi activitatea fosfomonoesterazelor cu optimul de pH = 9,2 şi 5,4, cu ajutorul metodei Jenner şi Kay, modificată de Folley şi Kay [20].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rolul aportului de vitamine B şi al insuficienţei lor în hrana păstrăvilor asupra compuşilor fosfatici determinaţi în eritrocite s-a apreciat prin compararea valorilor medii obţinute la fiecare lot în parte, contîndu-se numai pe deosebirile garantate de calculul statistic. Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabela 1. Examinînd aceste rezultate, se observă că, la lotul hrănit cu hrană fără adaos de 8% drojdie de bere ca sursă de vitamine B, fosforul anorganic prezintă valori mai scăzute după 3 săptămîni de experienţă, iar după 6 săptămîni el a continuat să scadă uşor.

Tabela 1

Compușii fosfatici din eritrocite (mg de fosfor la 100 ml de eritrocite) la păstrăvi cu și fără adaos de 8 % drojdie de bere în hrană

Temperatura apei 0° C (media pe perioadă)	18				17			
Perioada luării probelor față de data începerii experienței	la 3 săptămîni				la 6 săptămîni			
Numărul de exemplare cercetate	48	40			38	40		
Drojdie de bere 8%	+	−			+	−		
	M±m	M±m	p	± % față de martor	M±m	M±m	p	± % față de martor
P anorganic	35,37 ±0,68	30,42 ±0,40	<0,01	−14,00	36,02 ±0,40	28,97 ±0,32	<0,01	−19,56
P acidosolubil	53,75 ±0,57	47,06 ±0,56	<0,01	−12,58	54,85 ±0,49	46,92 ±0,54	<0,01	−14,46
P ușor hidrolizabil	8,00 ±0,25	6,94 ±0,16	<0,01	−13,25	8,19 ±0,19	6,13 ±0,27	<0,01	−25,16
P proteic și lipidic	141,77 ±0,90	137,59 ±0,42	<0,01	− 29,5	145,02 ±0,48	139,38 ±0,58	<0,01	− 3,89
P lecitină	33,64 ±0,24	32,12 ±0,34	<0,01	− 4,52	35,17 ±0,37	32,32 ±0,25	<0,01	− 8,11

Fosforul acidosolubil, care cuprinde fosforul anorganic și fosfații solubili în acid tricloracetic, mono-, di- și trinucleotid-fosfații, esterii fosforici și alți compuși fosfatici ai metabolismului intermediar, prezintă de asemenea valori mai mici la lotul căruia nu i s-a adăugat drojdie de bere în hrană, ceea ce demonstrează că o hrană săracă în vitamine B influențează negativ metabolismul fosfatic și al substanțelor dependente de acesta.

Fosforul ușor hidrolizabil, care cuprinde în cea mai mare parte ATP-ul și ADP-ul, este mai scăzut la lotul experimental în comparație cu martorul de-a lungul întregii perioade experimentale. Fosforul proteic și cel lipidic scad de asemenea în deficit de vitamine B în hrană. Sensul diferențelor dintre valorile fosforului lecitinic de-a lungul perioadei experimentale a evoluat în mod asemănător cu ale celorlalte forme de fosfor determinate, ceea ce denotă că un regim alimentar bogat în vitamine B favorizează trecerea lipidelor neutre în fosfolipide, așa cum reiese și din cercetările întreprinse de Gonțea și colab. [21], în care un regim cu un conținut de 6% drojdie de bere a favorizat trecerea lipidelor în fosfolipide în ficatul șoarecilor sănătoși.

Cu toate că fosforul total conținut în hrana ambelor loturi a fost același, în cazul deficitului de vitamine B din hrană a avut loc nu numai scăderea formelor de fosfor organic în eritrocite, ci și a fosforului an-

organic. Rezultate similare au fost observate şi în cazul administrării unei hrane cu un conţinut mai mare de fosfor total, dar cu un adaos de numai 1% drojdie de bere [15, tab. IV].

Pornind de la faptul că diferitele particularităţi ale metabolismului sînt o reflectare a particularităţilor proceselor enzimatice şi că studiul relaţiei dintre carenţa vitaminică B şi activitatea enzimelor atrage tot mai mult atenţia cercetătorilor [22]—[24], am urmărit cum se reflectă deficitul de vitamine B din hrana păstrăvilor şi asupra fosfomonoesterazelor eritrocitare.

După cum rezultă din datele prezentate în tabela 2, activitatea fosfomonoesterazelor cu optimul de pH = 9,2 şi a celei cu optimul de

Tabela 2

Activitatea fosfomonoesterazelor eritrocitare la păstrăvi cu şi fără adaos de 8% drojdie de bere în hrană

Temperatura apei °C (media pe perioadă)	18				17			
Perioada luării probelor faţă de data începerii experienţei	la 3 săptămîni				la 6 săptămîni			
Nr. de exemplare cercetate	28	22			31	27		
Drojdie de bere 8%	+	—			+	—		
Activitatea enzimatică (U.K.)	M±m	M±m	p	± % faţă de martor	M±m	M±m	p	± % faţă de martor
pH = 9,2	25,24 ±0,32	22,95 ±0,26	<0,01	−9,10	31,24 ±0,34	23,12 ±0,74	<0,01	−26,01
pH = 5,4	17,58 ±0,21	16,20 ±0,24	<0,01	−7,87	18,28 ±0,58	15,92 ±0,62	<0,01	−12,92

pH = 5,4 prezintă o scădere semnificativă la lotul căruia nu i s-a adăugat în hrană 8% drojdie de bere faţă de lotul martor, scădere ce se accentuează după 6 săptămîni de la începerea experienţei.

Determinînd şi conţinutul de hemoglobină după tehnica folosită anterior [18], aşa cum se observă în figura 1, după 3 săptămîni de administrare a hranei fără adaos de drojdie de bere majoritatea determinărilor se grupează între 9 şi 10 g% hemoglobină, iar după 6 săptămîni hemoglobina a fost cuprinsă între 8,6 şi 9,6 g%. La lotul căruia i s-a administrat hrană cu adaos de 8% drojdie de bere atît după 3, cît şi după 6 săptămîni de experienţă, majoritatea valorilor sînt cuprinse între 10,6 şi 11,6 g% hemoglobină. Aceste date sînt în sensul celor observate de

Halver [6] în cazul deficitului de vitamine hidrosolubile din hrana salmonidelor.

Datele obținute asupra compușilor fosfatici și asupra activității fosfomonoesterazelor eritrocitare, ca și cele referitoare la hemoglobină, arată că prezența vitaminelor B în hrana artificială a peștilor nu numai

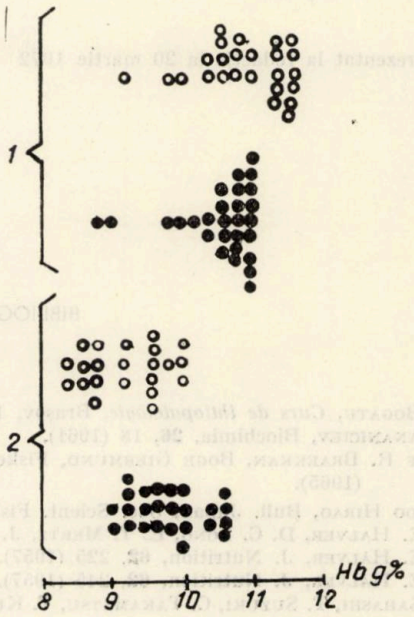


Fig. 1. — Conținutul de hemoglobină la păstrăvi cu și fără adaos de 8% drojdie de bere în hrană.
● — după 3 săptămini de experiență;
○ — după 6 săptămini de experiență;
1 — hrană cu adaos de 8% drojdie de bere;
2 — hrană fără adaos de 8% drojdie de bere.

că este absolut necesară, dar că asigurarea acestor vitamine într-o cantitate care să corespundă necesităților unui optim metabolic este de o importanță deosebită. De aceea considerăm că rezultatele noastre, care arată că un aport insuficient de vitamine B duce la scăderea activității fosfomonoesterazelor eritrocitare, enzime care intervin direct în metabolismul fosfatic, ca și a fosforului anorganic și a formelor de fosfor organic, nu pot fi lipsite de interes dacă ne gîndim că fosforul, pe lîngă că ocupă un loc central într-o serie de procese biologice importante, participă în combinațiile metabolismului celor trei clase de substanțe fundamentale (glucide, proteine și lipide) în majoritatea sistemelor enzimatice alături de vitamine, jucînd un rol de prim ordin în reacțiile de eliberare și de utilizare a energiei celulare.

CONCLUZII

Literatura arată că, în deficit de vitamine hidrosolubile, cantitatea de hemoglobină la pești scade, fapt constatat și de noi în insuficiența vitaminelor B.

Compuşii fosfatici, ca fosforul anorganic, fosforul acidosolubil, fosforul uşor hidrolizabil, fosforul proteic şi fosforul lecitinic din eritrocite, prezintă valori mai mici în insuficienţa vitaminelor B în comparaţie cu martorul, căruia i s-a administrat hrană cu adaos de 8% drojdie de bere.

În insuficienţa vitaminelor B, activitatea fosfomonoesterazelor cu optimul de pH = 9,2 şi 5,4 au prezentat valori mai scăzute în comparaţie cu cele obţinute la martor.

Prezentat la redacţie la 20 martie 1972

Universitatea „Al. I. Cuza", Iaşi,
Laboratorul de biochimie şi
Staţiunea de cercetări piscicole, Iaşi

BIBLIOGRAFIE

1. D. Bogatu, *Curs de ihtiopatologie*, Braşov, 1960.
2. A. Ananiciev, Biochimia, **26**, 18 (1961).
3. Olaf R. Braekkan, Boge Giermund, Fiskeridrekt skr. Ser. teknol. undersok., **4**, 115 (1965).
4. Imado Hirao, Bull. Japan, Soc. Scient. Fisheries, **20**, 736 (1954).
5. J. E. Halver, D. C. Long, E. T. Mertz, J. Nutrition, **63**, 95 (1957).
6. J. E. Halver, J. Nutrition, **62**, 225 (1957).
7. J. E. Halver, J. Nutrition, **62**, 245 (1957).
8. Y. Sahashi, T. Suzuki, C. Takamatsu, T. Kumar, E. Miyozawa, Vitamins, **26**, 388 (1962).
9. Y. Sahashi, T. Suzuki, C. Takamatsu, Y. Yoshida, A. Mickawa, T. Hasegawa, T. Esashi, Vitamins, **28**, 450 (1963).
10. C. Takamatsu, Hashimito Tokiro, Nishikawa Tesusaburo, Suzuki Takao, Sahashi Yoshikazu, J. *Vitaminology*, **11**, 275 (1965).
11. C. Takamatsu, T. Suzuki, Y. Sahashi, J. Agric. Sci. Tokyo Nagyo Daigaku, **7**, 221 (1962).
12. C. Takamatsu, T. Hashimato, T. Nishikawa, T. Suzuki, Y. Sahashi, J. Agric. Sci. Tokyo Nogyo Daigaku, **127** (1963).
13. * * * *O trecere în revistă a cunoştinţelor referitoare la furajarea peştilor*, Bibl. I. C. P., Bucureşti, 1964.
14. N. V. Pucikov, *Fiziologhia rib*, Moskva, 1954.
15. V. Jurcă, An. şt. Univ. Iaşi, s. I c, **XIV**, 105 (1968).
16. V. Jurcă, An. şt. Univ. Iaşi, s. I c, **XIV**, 113 (1968).
17. E. Văscăuţeanu, V. Jurcă, M. Apăvăloaie, An. şt. Univ. Iaşi, s. I, **VI**, 1127 (1960).
18. V. Jurcă, D. Matei, An. şt. Univ. Iaşi, s. I c, XIII, **115** (1967).
19. O. V. Travina, *Rukovodstvo po biohimiceskii issledovaniam*, Moskva, 1955.
20. S. Y. Folley, H. D. Kay, The phosphatases. Ergebn. Enzymforsch., **5**, 159 (1936).
21. I. Gonţea, M. Andrei, D. Popescu, Ch. Waserman, St. cerc. biochim., **10**, 239 (1967).
22. Hugh B. Lofland, Jr., O. Goodman-Harold, B. Thomas Clarkson, Robert W. Prichard, J. Nutrition, **79**, 188 (1963).
23. I. Btsch, K. Schiele, E. Kunsemüller, I. Benthien, Int. Z. Vitaminforsch., **39**, 384 (1969).
24. A. Ia. Ţiganenko, Vopr. med. himii, **17**, 364 (1971).
25. E. S. Jamdar, K. B. Udupa, A. Koatterji, Naturwissenschaften, **53**, 408 (1966).
26. S. R. Wagle, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., **121**, 15 (1966).

PHOSPHATE COMPOUND AND THE PHOSPHOMONOESTERASE ACTIVITY IN ERYTHROCYTES IN *SALMO GAIRDNERI* IN VITAMIN B DEFICIENCY

SUMMARY

Some changes induced by vitamin B deficiency in salmonid artificial diet (*Salmo gairdneri*) upon phosphorus compounds and phosphomonoesterase activity in erythrocytes are presented. Values of inorganic, acido-soluble, easily hydrolysable, protein and lecithin phosphorus as well as of phosphomonoesterase activities (9.2 and 5.4 optimum pH) are significantly decreased un trouts fed with a dier without vitamin B, as compared with controls which were given a diet with 8% yeast as source of vitamin B.

ST. CERC BIOCHIM., 15, 3, 271–277 (1972)

CANTITATEA ŞI CONCENTRAŢIA SUCURILOR PLASMATICE OBŢINUTE DIN FRUNZE DE VARZĂ ALBĂ ŞI VARZĂ ROŞIE, PREÎNCĂLZITE LA TEMPERATURI DIFERITE, ŞI DIN MERE, PERE ŞI GUTUI PĂSTRATE LA TEMPERATURA AMBIANTĂ

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — În lucrarea de faţă s-a urmărit comportarea biostructurii din reziduurile frunzelor de varză albă şi varză roşie preîncălzite la temperaturi diferite. S-a constatat că preîncălzirea timp de o oră la 40°C este suficientă ca să provoace destrămarea parţială a biostructurii, cu eliberare de apă şi de substanţe hidrosolubile. Destrămarea devine totală începînd de la 60°C în sus. S-a mai cercetat şi comportarea biostructurii din reziduurile fructelor de măr, păr şi gutui în cazul păstrării la temperatura ambiantă. Şi în aceste condiţii, biostructura nu este stabilă; după patru zile, stoarcerea reziduurilor dă o cantitate apreciabilă de suc plasmatic.

Din lucrări precedente [1]—[3] rezultă că atît volumul, cît şi indicele de refracţie al sucului vacuolar obţinut prin stoarcerea frunzelor de varză albă, varză roşie şi a fructelor de măr, păr şi gutui sînt mai mici decît ale sucului mixt obţinut din frunze şi fructe omorîte la temperaturi ridicate.

Interpretarea acestor date în lumina teoriei biostructurii duce la concluzia că temperaturile ridicate provoacă destrămarea biostructurii şi eliberarea din ea a unor cantităţi relativ mari de apă şi de substanţe hidrosolubile care se adaugă la sucul vacuolar, că eliberarea atît a apei, cît şi a substanţelor menţionate începe simultan la aceeaşi temperatură, dependentă de natura plantei, şi că la temperaturi ridicate, dar mai joase decît temperatura mortală minimă, materia biostructurată poate elimina numai o parte din apa şi din substanţele hidrosolubile care intră în alcătuirea ei.

Dat fiind că după îndepărtarea sucului vacuolar din materialul biologic vegetal proaspăt reziduul rămas în presă mai conţine materie biostructurată, era interesant de cercetat comportarea acesteia atît în cazul încălzirii reziduurilor, cît şi în cazul păstrării lor timp mai îndelungat la temperatura laboratorului. Asemenea cercetări încă nu s-au făcut, deşi ar prezenta interes pentru lămurirea comportării biostructurii aflate în alte condiţii decît cele normale din materialul biologic proaspăt. În adevăr, materia biostructurată rămasă în reziduuri nu mai este în contact cu soluţia intracelulară în care se produc reacţiile bio-

chimice furnizoare ale energiei necesare pentru menținerea integrității biostructurii, deoarece această soluție a fost îndepărtată prealabil sub formă de suc vacuolar. În consecință, biostructura se va destrăma, și această destrămare se va face cu atît mai repede, cu cît biostructura este mai sensibilă la lipsa aportului de energie. Apa și substanțele hidrosolubile, pe măsura eliberării lor din biostructură, vor forma în reziduuri o soluție nouă care nu a existat înainte și care poate fi stoarsă sub formă de suc plasmatic.

Deci, pentru a urmări comportarea biostructurii din reziduuri atît la temperaturi ridicate, cît și în decursul păstrării, ar urma să stoarcem din țesuturile vegetale proaspete sucul vacuolar, să încălzim apoi reziduurile la temperaturi diferite sau să le păstrăm mai multe zile la temperatura ambiantă, apoi să stoarcem aceste reziduuri pentru ca să obținem și să analizăm sucul plasmatic rezultat din destrămarea biostructurii.

Influența temperaturilor ridicate asupra biostructurii din reziduuri am cercetat-o pe frunze, iar influența păstrării la temperatura laboratorului timp de cîteva zile am cercetat-o pe fructe.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările le-am efectuat pe frunze de varză albă (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* D.C.f. *alba*), pe frunze de varză roșie (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* D.c.f. *rubra*), precum și pe mere (*Malus domestica*), pere (*Pirus sativa*) și gutui (*Cydonia oblonga*), ajunse la maturitatea de consum.

Frunzele proaspete se tăiau longitudinal de-a lungul nervurii principale, care se arunca. Din materialul foliar rămas se alcătuiau probe de cîte 200 g, care se storceau, obținîndu-se astfel sucul vacuolar.

Reziduurile rămase în presă se introduceau în borcane, iar acestea se închideau ermetic și se plasau în băi marine, care se încălzeau timp de o oră la 40, 60, 80 sau 100°C pentru varza albă și la 40, 50, 60, 80 sau 100°C pentru varza roșie. După răcirea probelor la temperatura laboratorului, se storceau și ele în aceleași condiții. Astfel se obținea sucul plasmatic.

Fructele se tăiau fiecare în cîte 5 segmente egale, partea cu semințe se îndepărta, apoi se alcătuiau 5 probe de cîte 100 g, folosind pentru fiecare probă cîte un segment de la mai multe fructe din aceeași specie.

Reziduurile rămase în presă după îndepărtarea sucului vacuolar au fost păstrate în borcane închise ermetic timp de patru zile la temperatura laboratorului (21—27°C), după care se storceau în aceleași condiții.

Stoarcerea atît a frunzelor, cît și a fructelor și a reziduurilor lor se făcea cu ajutorul unei prese hidraulice manuale de laborator tip Hafico, la presiunea de 300 atm pentru țesutul foliar și la 150 atm pentru fructe. Se măsura apoi cantitatea de suc, iar concentrația lui globală se determina, după centrifugare, prin măsurarea indicelui de refracție cu ajutorul refractometrului Abbe și se exprima în grame de zaharoză la 100 ml de suc, după tabelele lui Wagner [4]. Ținînd seama de volumul sucurilor obținute, se calcula și cantitatea totală de substanțe hidrosolubile conținută în ele, exprimată în zaharoză.

REZULTATE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Încălzind reziduurile din frunzele de varză albă de la 40°C în sus, ele dau prin stoarcere cantităţi mari de suc plasmatic, care întrec cu mult cantităţile de suc vacuolar obţinut din frunzele proaspete (tabela 1).

În privinţa indicilor de refracţie se constată că la sucurile plasmatice ei sînt în general mai mari decît la sucurile vacuolare, cu excepţia acelora care se obţin din reziduurile preîncălzite la 40°C. Aceasta înseamnă că, în general, concentraţia substanţelor hidrosolubile este mai mare în sucurile plasmatice decît în cele vacuolare.

În ceea ce priveşte cantităţile substanţelor hidrosolubile conţinute în întregul volum al sucurilor, tabela arată că sucul vacuolar conţine în general o cantitate relativ mică de substanţă hidrosolubilă, pe cînd sucul plasmatic conţine aceste substanţe în cantităţi cu mult mai mari, şi anume cu atît mai mari, cu cît temperatura la care a fost preîncălzit reziduul a fost mai ridicată. Faptul că începînd de la 60°C în sus volumul sucului plasmatic atinge cam aceleaşi valori ca în cazul încălzirii reziduurilor la 100°C înseamnă că, în intervalul de temperaturi de la 60—100°C, biostructura, destrămîndu-se, eliberează o cantitate maximă de apă. În schimb, eliberarea maximă de substanţe hidrosolubile din biostructură se face după preîncălzirea reziduurilor la 100°C.

Prin urmare, procesele de eliberare a apei şi a substanţelor hidrosolubile în biostructura reziduurilor frunzelor de varză albă preîncălzite la temperaturi diferite, deşi se produc simultan, nu sînt paralele. Aceasta înseamnă că repartiţia apei şi a substanţelor hidrosolubile în biostructura frunzelor de varză nu este identică.

Rezultate asemănătoare am obţinut şi în cazul frunzelor de varză roşie (tabela 2).

Reziduurile provenite din mere, pere şi gutui dau după patru zile, prin stoarcere, cantităţi apreciabile de suc plasmatic, cu deosebirea că în cazul merelor cantitatea sucului plasmatic este mai mică decît a sucului vacuolar, pe cînd în cazul perelor şi al gutuilor cantitatea sucului plasmatic depăşeşte cu mult cantitatea sucului vacuolar (tabela 3).

În privinţa substanţelor hidrosolubile conţinute în sucurile plasmatice, indicii de refracţie arată că la mere concentraţia lor este cam aceeaşi ca în sucul vacuolar, pe cînd la pere şi la gutui concentraţia este mai mică. Cum însă în cazul merelor volumul sucului plasmatic este mai mic decît al celui vacuolar, cantitatea substanţelor hidrosolubile cuprinse în totalitatea sucului plasmatic este mai mică, iar în cazul perelor şi mai ales al gutuilor ea este considerabil mai mare.

Aceste rezultate arată că biostructura rămasă în reziduurile diferitelor fructe se destramă chiar şi atunci cînd aceste reziduuri sînt păstrate la temperatura ambiantă.

CONCLUZII

Biostructura rămasă în reziduurile diferitelor frunze şi fructe după îndepărtarea sucului vacuolar nu este stabilă şi se destramă cu uşurinţă atît în cazul cînd reziduurile sînt încălzite la 40—100°C (cercetări pe

Tabela 1

Volumul (ml), indicele de refracție (n_D) și concentrația exprimată în zaharoză (g/100 ml) a sucurilor obținute prin stoarcerea la 300 atm a probelor de cîte 200 g de frunze de varză albă neîncălzite (suc vacuolar) și a reziduurilor acestora după încălzire timp de o oră la temperaturi diferite (suc plasmatic), precum și cantitatea totală de substanțe hidrosolubile conținute în aceste sucuri și exprimată în g de zaharoză

Nr. crt.	Data 1968	Suc vacuolar				Suc plasmatic				
		volumul (ml)	n_D	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoză totală g	t° C	volumul (ml)	n_D	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoză totală g
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	6.VI	35	1,3390	4,1	1,43	40	90	1,3385	3,7	3,33
2	27.VI	33	1,3383	3,5	1,17	40	59	1,3389	3,9	2,34
3	4.VI	35	1,3369	2,6	0,91	60	130	1,3392	4,2	5,48
4	26.VI	35	1,3369	2,6	0,91	60	100	1,3415	5,8	5,83
5	3.VI	11	1,3378	3,2	0,37	80	110	1,3415	5,8	6,41
6	25.VI	47	1,3368	2,5	1,18	80	105	1,3418	6,0	6,34
7	1.VI	14	1,3365	2,3	0,31	100	125	1,3416	5,9	7,49
8	24.VI	27	1,3382	3,5	0,94	100	130	1,3415	5,8	7,55

Tabela 2

Volumul (ml), indicele de refracție (n_D) și concentrația exprimată în zaharoză (g/100 ml) a sucurilor obținute prin stoarcere la 300 atm a probelor de cîte 200 g de frunze de varză roșie neîncălzite (suc vacuolar) și a reziduurilor acestora, după încălzire timp de o oră la temperaturi diferite (suc plasmatic), precum și cantitatea totală de substanțe hidrosolubile conținute în aceste sucuri și exprimată în g de zaharoză

Nr. crt.	Data 1968	Suc vacuolar				Suc plasmatic				
		volumul (ml)	n_D	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoză totală g	t°C	volumul (ml)	n_D	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoză totală g
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	14.IX	18	1,3375	3,0	0,54	40	26	1,3410	5,4	1,41
2	12.IX	20	1,3380	3,4	0,67	50	45	1,3425	6,5	2,92
3	10.IX	27	1,3380	3,4	0,95	60	115	1,3420	6,2	7,08
4	7.IX	22	1,3370	2,7	0,59	80	95	1,3450	8,2	7,84
5	16.IX	20	1,3370	2,7	0,54	100	129	1,3428	6,7	8,63

Tabela 3

Volumul (ml) indicele de refracţie (n_D) şi concentraţia exprimată în zaharoză (g/100 ml)a sucurilor obţinute prin stoarcere la 150 atm a probelor de cîte 50 g de fructe de măr, păr şi gutui la temperatura laboratorului (suc vacuolar) şi a reziduurilor acestora ţinute patru zile la temperatura laboratorului (suc plasmatic), precum şi cantitatea totală de substanţe hidrosolubile conţinute în aceste sucuri şi exprimată în g de zaharoză

Nr. crt.	Data 1969	Suc vacuolar				Suc plasmatic (stors din reziduuri după 4 zile de păstrare)				
		volumul (ml)	n_D	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoză totală g	t°C	volumul (ml)	n_D	conc. în zaharoză g/100 ml	zaharoză totală g
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
				MĂR						
1	10.X	33	1,3480	10,3	3,41	23	13	1,3479	10,3	1,33
2	14.X	10	1,3509	12,4	3,72	23	11	1,3481	10,4	1,14
				PĂR						
1	25.XI	23	1,3499	11,7	2,69	26	36	1,3455	8,6	3,09
2	25.XI	28	1,3475	10,0	2,80	27	46	1,3450	8,3	3,79
				GUTUI						
1	13.X	16	1,3485	10,7	1,71	26	44	1,3447	8,0	3,54
2	18.X	17	1,3487	10,9	1,84	25	42	1,3445	7,9	3,32

frunze), cît și atunci cînd reziduurile sînt păstrate la temperatura ambiantă (cercetări pe fructe).

Această instabilitate a biostructurii se datorește lipsei aportului de energie metabolică în urma îndepărtării din țesuturile vegetale a soluției intracelulare în care se desfășoară biochimismul dătător de energie, necesară menținerii și integrității materiei biostructurate.

Prezentat la redacție la 19 aprilie 1972

Facultatea de biologie
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovski, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
2. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. și cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
3. A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **14**, 57 (1971).
4. B. Wagner, *Tabellen zum Eintauchrefraktometer*, Sondershausen, VIII, 46, Tab. 72, 1907.

THE AMOUNT AND CONCENTRATION OF PLASMATIC SAPS OBTAINED FROM LEAVES OF WHITE AND RED CABBAGE, PREVIOUSLY HEATED AT DIFFERENT TEMPERATURES AS WELL AS FROM APPLES, PEARS AND QUINCES KEPT AT ROOM TEMPERATURE

SUMMARY

The present paper investigates the behaviour of biostructure from the white and red cabbage leaves' residues heated at different temperatures. It has been stated that the heating for 1 hour at 40°C is sufficient to bring about a partial teasing of the biostructure, releasing water and hydrosoluble substances. The teasing was total from 60°C onwards.

It was also considered the behaviour of biostructure from apple, pear and quince fruits when kept at room temperature. In these conditions too, the biostructure is not stable; after 4 days, by squeezing out the residues, we got a great amount of plasmatic juice.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 279–287 (1972)

CORELAŢII ÎNTRE EFECTUL UNOR INHIBITORI METABOLICI, ACTIVITATEA LACTAT- ŞI SUCCINAT-DEHIDROGENAZEI ŞI PROCESUL DE REPLICARE A VIRUSULUI URLIAN

E. PRAHOVEANU, M. ŞERBAN şi Y. COPELOVICI

Rezumat. — Virusul urlian, tulpina „V" autohtonă, determină o creştere semnificativă a nivelului LDH în lichidul alantoidian al ouălor embrionate inoculate cu acest virus.

Inhibitori ai catenei glicolitice NaF şi în special MIA exercită un efect de diminuare a activităţii LDH, începînd de la 12 ore în cazul MIA ($1 \cdot 10^{-3}$ M) şi, respectiv, de la primele 3 ore în cazul NaF ($2 \cdot 10^{-3}$ M), efect însoţit şi de o diminuare concomitentă a capacităţii de replicare virală.

MIA induce şi o scădere a activităţii SDH la 48 de ore de la inoculare, scădere care ar putea fi atribuită diminuării substratului furnizat de catena glicolitică ciclului acizilor tricarboxilici sau/şi modificărilor exercitate de virus la nivelul mitocondriilor.

Unul din cele mai tipice caractere ale sistemului virus-celulă-gazdă este dependenţa mecanismului de sinteză virală de ţesutul în care se replică virusul.

Importanţa celulei-gazdă cu „metabolizare activă" pentru producerea de virus a fost de mult recunoscută [1], [12], [13], [18], [19]. Unii autori, ca Ackermann [1], Eagle şi colab. [4], Eagle şi Habel [5], au subliniat necesitatea prezenţei glucozei pentru sinteza virusului gripal APR8 pe oul embrionat şi a virusului poliomielitei pe celule Hela, demonstrînd participarea atomilor de carbon din acest substrat la sinteza acidului nucleic viral prin intermediul celulei-gazdă. Alţi cercetători au evidenţiat, de asemenea, stimularea încorporării glucozei în cazul infecţiilor virale, atribuind această creştere unei viteze mult mărite a glicolizei în celulele supuse infecţiei [6], [7], [11], [16], [19]. Becker şi colab. [2] susţin că încorporarea unui substrat ca glucoza de către celulele infectate este mai strîns legată de procesul de replicare a virusului decît eliberarea în mediu a unui produs final cum este acidul lactic.

Asupra relaţiei directe dintre metabolismul glucidic al celulelor infectate şi inhibitori există puţine informaţii. În general, cercetările întreprinse s-au referit în special la efectul unor inhibitori metabolici asupra sintezei virusului gripal şi a celui vaccinal [11], [16], [21], iar implicaţiile biochimice ale acestui efect la nivelul metabolismului glucidic nu au fost investigate la diferite virusuri.

De aceea în această lucrare ne-am propus, pe de o parte, să urmărim, în cazul virusului urlian, efectul indus de inhibiţia cu monoiodacetat (MIA) şi florură de sodiu (NaF) asupra acestui virus, iar pe de alta comportarea activităţii lactat-dehidrogenazei (LDH), ca enzimă a catenei glicolitice, şi a succinat-dehidrogenazei (SDH), ca enzimă din ciclul acizilor tricarboxilici, în condiţiile replicării virale şi ale acţiunii inhibitorilor menţionaţi.

Aceste cercetări se încadrează în preocupările noastre referitoare la unele aspecte biochimice ale relaţiei virus-celulă-gazdă îşi reprezintă de fapt o continuare a unor cercetări anterioare [14], [15], [18], [20].

MATERIALE ŞI METODE

Virusul folosit a fost cel urlian, tulpina „V" autohtonă, întreţinută în laborator pe oul embrionat 76 de pasaje. Titrul infectant a fost de $10^{-5,7}$, iar titrul hemaglutinant 1/640 [3]. Experienţele au fost efectuate pe un număr de 400 de ouă embrionate în vîrstă de 7 zile, împărţite în 6 loturi : lot infectat cu virus (martor +virus), lot infectat cu virus+MIA, lot infectat cu virus + NaF, lot martor (ouă neinfectate), /lot martor+ MIA şi lot martor + NaF.

Loturile de ouă care au primit virus au fost inoculate cu 0,1 ml de lichid alantoidian infectant, diluat cu soluţie de NaCl 0,145 M şi conţinînd $DIE_{50} = 100$.

Ouăle reprezentînd loturile-martor au fost inoculate cu 0,1 ml de soluţie de NaCl 0,145 M.

Inhibitorii utilizaţi au fost MIA şi NaF. Cantitatea de soluţie de inhibitori introdusă a fost de 0,1 ml, iar concentraţia iniţială a acestora a fost de $1 \cdot 10^{-3}$ M în cazul MIA şi de $1 \cdot 10^{-3}$ M, respectiv $2 \cdot 10^{-3}$ M, în cazul NaF. Inocularea s-a făcut cu 15 min înaintea infectării cu virus sau a introducerii de soluţie de NaCl 0,145 M/ la lotul-martor. Incubarea a fost realizată la temperatura de + 35°C. La intervalele de timp de 3, 6, 12, 24, 48, 72 şi 96 de ore, ouăle respective (cîte 5 din fiecare lot) au fost sacrificate şi au fost păstrate timp de 24 ore la +4°C pînă la recoltarea lichidului alantoidian. O parte din lichidul alantoidian recoltat a fost folosit pentru testul de hemaglutinare, iar o altă parte a fost centrifugat la 4 000 × g la +4°C timp de 15 min şi folosit pentru determinările enzimatice.

Testul de hemaglutinare a fost făcut calitativ pentru fiecare ou inoculat sau martor, punîndu-se în contact o cantitate de 0,5 ml de lichid alantoidian de testat cu 0,5 ml de suspensie de hematii de găină 0,5%.

Activitatea enzimatică LDH a fost determinată spectrofotometric după tehnica descrisă într-o lucrare anterioară [14]. Activitatea SDH a fost determinată după tehnica lui Salter şi Bonner [17].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele obţinute reiese că multiplicarea virusului urlian, tulpina „V", în oul embrionat este asociată cu modificări ale activităţilor enzi-

matice. Aceste activităţi sînt, de asemenea, influenţate de prezenţa inhibitorilor inoculaţi.

Astfel, din figura 1 se constată că inocularea virusului determină o creştere evidentă a activităţii LDH, în comparaţie cu lotul-martor (M). Această creştere se observă încă din primele 3 ore după inocularea virusului şi se menţine pînă la 12 ore. După acest interval se evidenţiază o

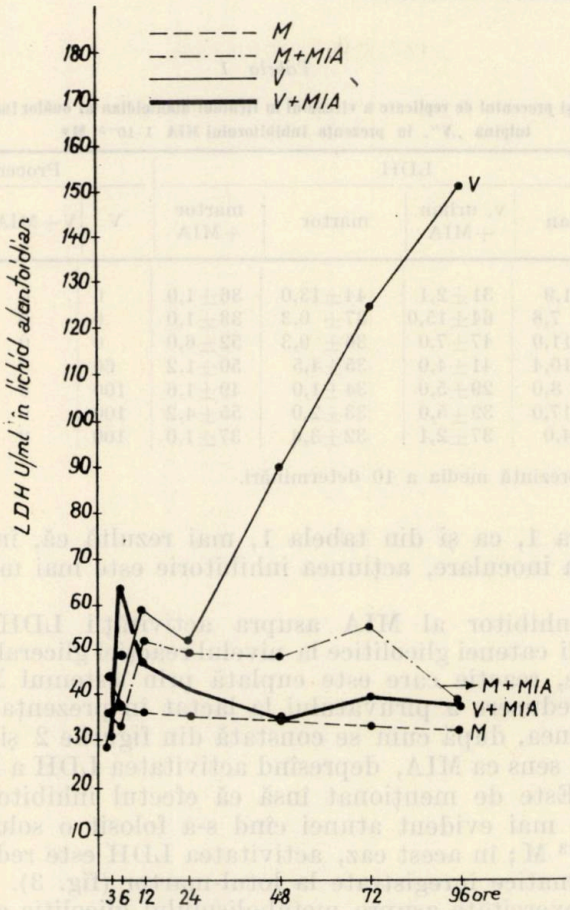


Fig. 1. — Activitatea LDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate neinoculate (*M*) şi inoculate (*V*) cu virusul urlian, tulpina „V", în prezenţa şi absenţa inhibitorului MIA ($1 \cdot 10^{-3}$ M).

uşoară scădere, pentru ca apoi valorile activităţii enzimatice să crească proporţional cu multiplicarea virusului, ştiut fiind că virusul urlian este sintetizat complet între 24 şi 48 de ore; într-adevăr, aceste valori reprezintă pentru intervalul de 72—96 de ore de la inoculare o stimulare de aproape 4—5 ori în raport cu valoarea activităţii enzimei la lotul-martor(M).

Prin folosirea unor inhibitori ca MIA şi NaF, care acţionează la nivele diferite ale catenei glicolitice, am urmărit evidenţierea unor core-

laţii între metabolismul glucidic anaerob şi procesul de multiplicare a virusului.

Din figura 1 rezultă acţiunea net inhibitorie pe care o exercită MIA asupra activităţii LDH, respectiv asupra multiplicării virusului. În prezenţa MIA, curba activităţii enzimatice este redusă practic la nivelul valorilor înregistrate în cazul lotului-martor, mai ales începînd de la 12 ore după inocularea virusului.

Tabela 1

Activitatea LDH U/ml şi procentul de replicare a virusului în lichidul alantoidian al ouălor inoculate cu virus urlian, tulpina „V", în prezenţa inhibitorului MIA $1 \cdot 10^{-3}$ M*

Ore după inoculare	LDH				Procent lot ouă			
	v. urlian	v. urlian +MIA	martor	martor +MIA	V	V+MIA	M	M+MIA
3 ore	29±1,9	31±2,1	44±13,0	36±1,0	0	0	0	0
6 „	49± 7,8	64±15,0	37± 0,3	33±1,0	0	0	0	0
12 „	59±11,0	47±7,0	36± 0,3	52±6,0	0	0	0	0
24 „	52±10,4	41±4,0	35±4,5	50±1,2	60	0	0	0
48 „	90± 8,0	29±5,0	34±1,0	49±1,6	100	0	0	0
72 „	125±17,0	39±5,0	33±2,0	55±4,2	100	0	0	0
96 „	151±4,0	37±2,1	32±3,6	37±1,0	100	0	0	0

* Cifrele reprezintă media a 10 determinări.

Din figura 1, ca şi din tabela 1, mai rezultă că, în intervalul de 3—12 ore de la inoculare, acţiunea inhibitorie este mai mică decît după 12 ore.

Efectul inhibitor al MIA asupra activităţii LDH se datoreşte, evident, blocării catenei glicolitice la nivelul reacţiei gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazice, reacţie care este cuplată prin sistemul $NAD \rightleftarrows NADH_2$ cu reacţia de reducere a piruvatului la lactat în prezenţa LDH.

De asemenea, după cum se constată din figurile 2 şi 3, NaF acţionează în acelaşi sens ca MIA, depresînd activitatea LDH a lotului infectat cu virus (V). Este de menţionat însă că efectul inhibitor exercitat de NaF este mult mai evident atunci cînd s-a folosit o soluţie în concentraţia de $2 \cdot 10^{-3}$ M; în acest caz, activitatea LDH este redusă la valorile activităţii enzimatice înregistrate la lotul-martor (fig. 3).

Efectele exercitate asupra metabolismului glicolitic al celulei-gazdă prin cei doi inhibitori specifici ai glicolizei se corelează cu acţiunea pe care această inhibiţie o manifestă şi asupra virusului, respectiv asupra capacităţii de replicare virală. Această observaţie este ilustrată în tabelele 1 şi 2, în care sînt redate în mod comparativ valorile activităţii LDH şi posibilitatea de reproducere a virusului în procente. Rezultă că, dacă MIA $1 \cdot 10^{-3}$ M inhibă complet replicarea virusului, în cazul NaF de o concentraţie similară ($1 \cdot 10^{-3}$ M) se pot observa încă valori mai crescute ale activităţii LDH, precum şi o replicare a virusului în proporţie de 75%, în perioadele 6—24 şi 72—96 de ore. În cazul utilizării NaF în concentraţie de $2 \cdot 10^{-3}$ M, efectul inhibiţiei atît asupra activităţii LDH, cît şi asupra replicării virusului urlian este însă practic total la toate intervalele de timp de la inoculare.

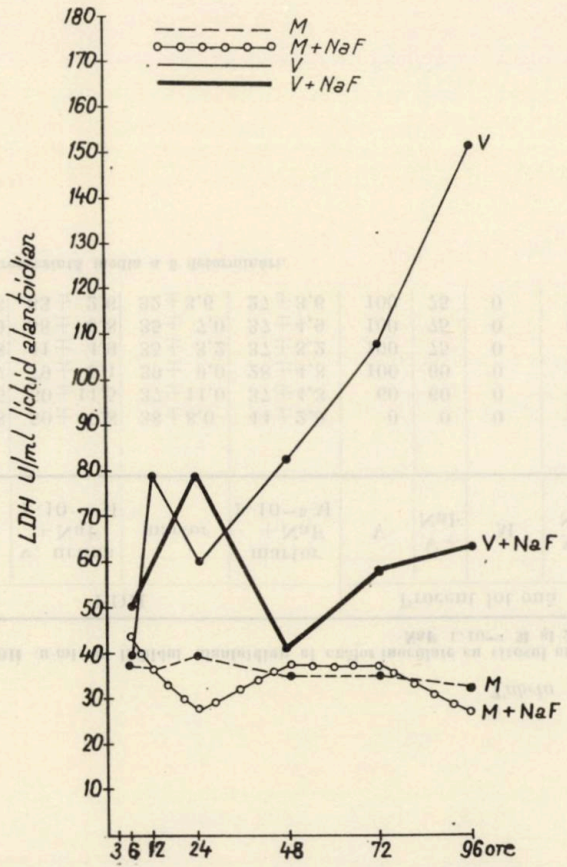


Fig. 2. — Activitatea LDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate neinoculate (*M*) și inoculate (*V*) cu virusul urlian, tulpina ,,V'', în prezența inhibitorului NaF ($1 \cdot 10^{-3}$ M).

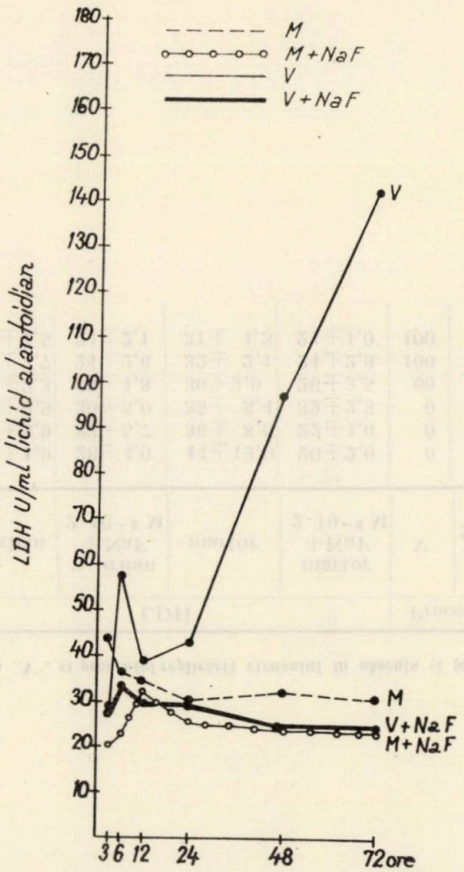


Fig. 3. — Activitatea LDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate neinoculate (*M*) și inoculate (*V*) cu virusul urlian, tulpina ,,V'', în prezența inhibitorului NaF ($2 \cdot 10^{-3}$ M).

Tabela 2

Activitatea LDH (u/ml) în lichidul alantoidian al ouălor inoculate cu virusul urlian, tulpina „V", şi procentul replicării virusului în absenţa şi prezenţa NaF $1 \cdot 10^{-3}$ M şi $2 \cdot 10^{-3}$ M*

Ore după inoculare	LDH				Procent lot ouă				LDH				Procent lot ouă			
	v. urlian	v. urlian +NaF $1 \cdot 10^{-3}$ M	martor	martor +NaF $1 \cdot 10^{-3}$ M	V	V+ NaF	M	M+ NaF	v. urlian	v. urlian +NaF $2 \cdot 10^{-3}$ M	martor	martor +NaF $2 \cdot 10^{-3}$ M	V	V+ NaF	M	M+ NaF
3 ore									29±1,9	28±4,0	44±13,0	20±2,0	0	0	0	0
6 ,,	40±2,8	50± 7,8	38±8,0	44±2,9	0	0	0	0	58±5,9	33±5,7	36± 8,5	22±1,0	0	0	0	0
12 ,,	69±8,5	60±11,5	37±11,0	37±4,3	60	60	0	0	39±2,9	30±3,0	35± 3,4	32±2,3	0	0	0	0
24 ,,	60±6,7	79± 5,1	39± 9,0	28±4,8	100	60	0	0	43±2,3	29±4,8	30±2,9	26±2,5	60	0	0	0
48 ,,	82±7,8	41± 4,9	35± 3,2	37±8,2	100	75	0	0	98±3,7	24±2,6	32± 2,1	24±2,9	100	0	0	0
72 ,,	108±5,0	58± 6,8	35± 7,0	37±4,9	100	75	0	0	142±7,5	24±2,1	31± 4,3	24±1,0	100	0	0	0
96 ,,	151±3,6	63± 2,6	32±3,6	27±3,6	100	75	0	0								

* Cifrele reprezintă media a 5 determinări.

Datele prezentate sugerează că infecţia produsă de virusul urlian induce o intensificare a proceselor glicolitice cu eliberare de energie utilizată în sinteza virală, intensificare care se corelează cu creşterea activităţii LDH. Este probabil ca infecţia virală să determine şi o intensificare a biosintezei enzimei [14], [15], [18], [20]—[22].

Totodată, inhibarea catenei glicolitice la nivelul gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazei (MIA) şi a enolazei (NaF) se corelează cu procesul de replicare virală, care este diminuat sau chiar inhibat prin blocarea catenei glicolitice.

Deşi MIA şi NaF sînt inhibitori ai glicolizei, pe lîngă urmărirea activităţii LDH ca enzimă implicată în secvenţa finală a catenei glicolitice, s-au efectuat totuşi unele determinări şi asupra SDH, enzimă din ciclul acizilor tricarboxilici, cu scopul de a constata modul cum se repercutează la nivelul acestui ciclu efectul MIA în infecţia cu virusul urlian şi în condiţiile în care catena glicolitică a fost afectată.

În figura 4 este prezentată activitatea succinat-dehidrogenazei în lichidul alantoidian al ouălor embrionate, inoculate cu aceeaşi tulpină de virus.

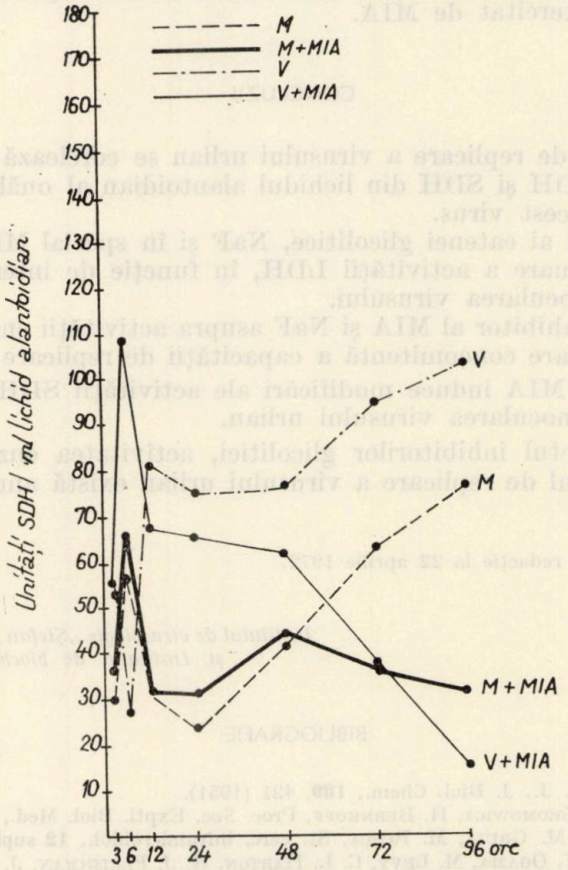


Fig. 4. — Activitatea SDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate neinoculate (*M*) şi inoculate (V) cu virusul urlian, tulpina „V", în prezenţa inhibitorului MIA ($1 \cdot 10^{-3}$ M).

Inocularea virusului produce asupra acestei enzime o scădere în primele 3—6 ore, pentru ca după 6 ore activitatea enzimei SDH să crească, menţinîndu-se la valori apropiate între 12 şi 48 de ore, dar cu mult peste nivelul activităţii SDH a lotului-martor (M).

Succinat-dehidrogenaza este o enzimă mitocondrială, care aparţine lanţului respirator al celulei [8]—[10], [22]. Scăderea activităţii enzimei în primele ore de la inocularea virusului se datoreşte, probabil, unei acţiuni inhibitoare a virusului urlian asupra respiraţiei celulei-gazdă.

Faptul că după 12 ore se constată o activitate de aproape trei ori mai mare a SDH s-ar explica prin eliberarea ei din mitocondrii, a căror structură poate fi alterată într-un anumit grad de prezenţa virusului.

MIA nu exercită un efect complet inhibitor între 12 şi 48 de ore, activitatea SDH fiind apropiată de a lotului infectat cu virus. Începînd însă de la 48 de ore de la inocularea virusului, MIA determină o diminuare a activităţii SDH; scăderea după un anumit interval de timp a activităţii SDH în prezenţa MIA poate fi atribuită diminuării substratului ciclului acizilor tricarboxilici furnizat de calea glicolitică, inhibată prin efectul exercitat de MIA.

CONCLUZII

Procesul de replicare a virusului urlian se corelează cu o creştere a activităţii LDH şi SDH din lichidul alantoidian al ouălor embrionate, inoculate cu acest virus.

Inhibitori ai catenei glicolitice, NaF şi în special MIA exercită un efect de diminuare a activităţii LDH, în funcţie de intervalul de timp scurs de la inocularea virusului.

Efectul inhibitor al MIA şi NaF asupra activităţii enzimatice determină o diminuare concomitentă a capacităţii de replicare virală.

Prezenţa MIA induce modificări ale activităţii SDH abia după 48 de ore de la inocularea virusului urlian.

Între efectul inhibitorilor glicolitici, activitatea enzimatică LDH, SDH şi procesul de replicare a virusului urlian există anumite corelaţii.

Prezentat la redacţie la 22 aprilie 1972.

Institutul de virusologie „Ştefan S. Nicolau"
şi Institutul de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. Ackermann, W. J., J. Biol. Chem., **189**, 421 (1951).
2. Becker J., V. Gromowicz, H. Bernkopf, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **97**, 77 (1958).
3. Copelovici Y., M. Gruia, M. Roşca, St. cerc. inframicrobiol., **12** supl., 207 (1961).
4. Eagle H., W. Y. Ogama, M. Levy, C. L. Harton, R. J. Fleishman, J. Biol. Chem., **218**, 607 (1956).
5. Eagle H., K. Habel, J. exptl. med., **104**, 271 (1956).
6. Gifford G. E., J. J. Syverton, Fed. Proc., **16**, 414 (1957).

7. Gordon E., E. Ernster, G. Dollner, Cancer Res., **27**, 1372 (1967).
8. Green D. E., H. Baum, *Energy and the mitochondrion*, New York—Londra, Acad. Press, 1970, p. 7 şi 23.
9. Hammers G. H., C. Wen Wu, Science, **172**, 389 (1971).
10. Hanstein W. G., K. Davis, M. Ghalanbar, Y. Matefi, Biochemistry, **10**, 2517 (1971).
11. Kolter S., A. K. Enster, Arch. ges. Virusforsch., **20**, 180 (1971).
12. Levy H. B., S. Baron, J. Infect. Dis., **100**, 109 (1957).
13. Mekee R. W., W. Wong, M. Landman, Biochim. Biophys. Acta, **105**, 410 (1965).
14. Prahoveanu E., Mihail Şerban, I. Moisa, St. cerc. biochim., **13**, 313 (1970).
15. Prahoveanu E., Mihail Şerban, R. Lupu, M. Gruia, St. cerc. biochim., **15**, 79 (1972).
16. Ross L. J., N. Wattson, D. H. Willy, J. gen. Virusology, **2**, 115 (1968).
17. Salter E. S., W. D. Bonner, Biochem. J., **521**, 185 (1952).
18. Săraţeanu D., S. Biller, E. Prahoveanu, S. Botis, V. Gheorghiu, A. Babos, Rev. roum. inframicrobiol., **1**, 317 (1964).
19. Seymon S., P. H. D. Cohen, *Viral and Rickettsial infection of man*, Ed. Horsfall & Tamm, ed. a 4-a, 1965, p. 175.
20. Şerban Mihail, E. Prahoveanu, St. cerc. biochim., **13**, 79 (1971).
21. Tien P., P. S. Tang, Acta Virologica, **7**, 368 (1963).
22. Wolpert L., Nature, **219**, 1084 (1968).

CORRELATIONS BETWEEN THE EFFECT OF SOME METABOLIC INHIBITORS, LACTATE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITIES AND THE REPLICATION PROCESS OF THE URLIAN VIRUS

SUMMARY

Embryo eggs, inoculated with urlian virus, native "V" strain, show a significant increase in LDH activity at the allantoid fluid level.

NaF and particularly MIA, inhibitors of the glycolytic pathway, induce a diminution of LDH acivity after 3 hrs (2×10^{-3} M NaF) and 12 hrs (1×10^{-3} M MIA) respectively; this effect is also accompanied by a concomitant diminution of viral replication capacity.

MIA also induces a decrease in SDH activity in the 48 hrs after inoculation; this decrease could be attributed to a diminution of the substrate supplied by the glycolytic pathway, the tricarboxylic acid cycle and/or to the changes induced by the virus at the level of mitochondria.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 289–298 (1972)

INFLUENȚA IONILOR DE POTASIU ASUPRA PERMEABILITĂȚII ȘI CONȚINUTULUI ÎN APĂ TOTALĂ ȘI ACID LACTIC LA MUȘCHII SARTORIUS ȘI GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Ionul de K^+ introdus în mediul de imersiune al mușchilor sartorius și gastrocnemieni de broască produce, atît în soluție hipertonică, cît și izotonică, o scădere evidentă a conținutului în acid lactic al mușchilor, scădere proporțională cu creșterea concentrației de KCl din mediu. Ionul K^+ determină de asemenea creșterea permeabilității membranei musculare pentru difuzia acidului lactic în mediul de imersiune. K^+ în soluție hipertonică sau izotonică scade și, respectiv, mărește conținutul în apă totală al mușchilor. Absența K^+ din mediul de imersiune mărește ușor cantitatea apei totale, fără a afecta conținutul și exosmoza acidului lactic.

Efectul K^+ asupra conținutului în acid lactic este similar celui produs asupra acidului piruvic, ceea ce relevă strînsa legătură dintre metabolismul anaerob și cel aerob sub influența K^+.

În legătură cu pătrunderea K^+ din mediul extern în mușchi, literatura prezintă date contradictorii. Astfel Show și colab. [1] găsesc că nivelul K^+ intracelular nu este influențat de concentrația K^+ extern pînă la concentrația de 50 mM/l, în timp ce Boyle și Conway [2], Netter și colab. [3], [4], precum și Muller și Simon [5], arată că K^+ pătrunde în celulă proporțional cu creșterea concentrației sale externe.

Este cunoscut faptul că concentrațiile externe crescute de K^+ modifică unele caracteristici fizice ale membranei musculare [6]—[13], precum și metabolismul mușchiului [14]—[21].

Într-o lucrare anterioară [22] am arătat că ionul K^+, adăugat mediului de imersiune a mușchiului sartorius de broască, produce o scădere a acidului piruvic. De aceea ni s-a părut interesant de urmărit dacă influența exercitată de K^+ asupra acidului piruvic [22], component care leagă calea de degradare anaerobă de cea aerobă [23], se menține și în cazul acidului lactic, ultimul termen al glicolizei [24].

Influența K^+ s-a urmărit adăugînd KCl la constituenții obișnuiți ai soluției Ringer, aceasta devenind oarecum hipertonică. Deoarece hiperosmolaritatea stimulează pătrunderea și metabolizarea glucozei în mușchi [25], ca și eliberarea lactatului într-un mediu lipsit de glucoză [26], în lucrarea de față ne-am propus să urmărim influența exercitată de K^+ în mediu atît hipertonic, cît și izotonic.

Lucrarea mai are scopul să urmărească dacă creşterea determinată de K^+ a permeabilităţii membranei musculare pentru difuzia acidului piruvic [22] se menţine, la muşchiul sartorius şi gastrocnemian de broască, şi în cazul acidului lactic.

În lucrarea de faţă s-a urmărit şi efectul K^+ asupra conţinutului în apă totală al muşchiului.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele noastre au fost efectuate pe muşchi sartorius şi gastrocnemieni de broască (*Rana ridibunda*). La două ore după ce măduva spinării a fost distrusă, muşchii sartorius au fost izolaţi cu grijă pentru a se evita vreo traumă, tamponaţi uşor pe hîrtie de filtru, cîntăriţi şi apoi imersaţi în soluţiile corespunzătoare. În experienţele efectuate pe muşchiul gastrocnemian, picioarele posterioare ale broaştei asupra cărora nu s-a aplicat nici un tratament prealabil au fost amputate simultan, iar muşchii au fost izolaţi de asemenea cu atenţie şi prelucraţi ca mai sus.

La martor, muşchii sartorius şi gastrocnemieni au fost imersaţi în 10, respectiv 12 ml de soluţie Ringer-Jendrassik [27], conţinînd la litru 6,5 g de clorură de sodiu, 0,2 g de clorură de calciu, 0,2 g de clorură de potasiu şi 0,1 g de bicarbonat de sodiu. Pentru studierea efectului concentraţiilor diferite de ioni de K^+, aceştia erau introduşi sub formă de KCl în aceleaşi volume de soluţie Ringer, în concentraţii variind între 0 şi 50 mM/l, ceilalţi constituenţi fiind în concentraţia menţionată mai sus.

Deoarece soluţia Ringer devenea astfel hipertonică, într-o altă serie de experienţe, pentru a menţine izotonicitatea soluţiei Ringer, conţinutul în Na^+ a fost redus în proporţie echivalentă cantităţii de K^+ adăugate, cel de Cl^- rămînînd deci constant.

Muşchii au fost imersaţi timp de trei ore şi jumătate, sub barbotare continuă şi uniformă cu un curent de oxigen 100%. La intervale de aproximativ 20 min, conţinutul vasului de imersiune se agita uşor. La sfîrşitul perioadei de imersiune, muşchii sartorius, respectiv gastrocnemieni, îndepărtaţi din soluţia Ringer corespunzătoare, au fost imediat tamponaţi uşor pe hîrtie de filtru, mărunţiţi, cîntăriţi şi apoi omogenizaţi la rece într-un omogenizator Potter cu 3 ml la muşchiul sartorius, respectiv 7 ml de acid tricloracetic 10% la muşchiul gastrocnemian. Extractul tricloracetic a fost apoi centrifugat la 4 500 de ture/min timp de 15 min. Pentru dozarea acidului lactic, efectuată după metoda Barker şi Summerson [28], s-au folosit 1,5, respectiv 1,0 ml de supernatant.

S-a determinat atît conţinutul în acid lactic al muşchiului, cît şi cantitatea difuzată în soluţia de imersiune, pentru ca însumarea celor două valori să reflecte cantitatea de acid lactic existentă la sfîrşitul experienţei. Pentru dozarea acidului lactic în soluţia de imersiune s-au folosit 8, respectiv 3 ml. Rezultatele au fost exprimate în mg/100 g de muşchi umed cînd ne-am referit la conţinutul muşchilor în acid lactic, iar valorile pentru acidul lactic exosmozat sînt exprimate în μg/muşchi.

Determinarea de apă totală s-a efectuat la muşchii imersaţi în soluţie Ringer hipertonică doar pe muşchi gastrocnemieni, deoarece influenţa K^+ asupra conţinutului în apă totală al muşchiului sartorius

de broască a fost semnalată anterior [22]. Muşchii au fost imersaţi în aceleaşi condiţii ca la determinarea acidului lactic, iar apa s-a determinat prin cîntărire, înainte şi după uscare pînă la greutate constantă, şi s-a exprimat în g/g de substanţă uscată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Înainte de a trece la determinările propriu-zise, am urmărit conţinutul în apă totală al muşchilor-pereche imersaţi în soluţie Ringer fără adaos de KCl şi am constatat că muşchii simetrici conţin cantităţi aproape egale de apă totală. Tabela 1 arată că şi pentru acidul lactic din muşchi, ca şi pentru cel exosmozat, se obţin valori apropiate. Acest fapt a permis să se urmărească pe acelaşi animal influenţa exercitată de ionul K^+ asupra glicolizei, ca şi asupra permeabilităţii membranei musculare pentru acidul lactic.

Tabela 1

Conţinutul şi exosmoza acidului lactic la muşchii simetrici sartorius şi gastrocnemian de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik

A = muşchi sartorius
B = muşchi gastrocnemian

Muşchi sting = S
Muşchi drept = D

	Greutatea muşchilor g		Acid lactic în muşchi mg/100 g ţesut umed		Acid lactic exosmozat µg		Acid lactic produs în timpul experienţei µg/muşchi	
	D	S	D	S	D	S	D	S
				A				
	0,10	0,09	101	108	27	36	128	133
	0,12	0,11	85	84	25	14	127	106
	0,12	0,12	79	82	25	30	132	128
	0,10	0,10	97	94	52	57	149	151
Media	0,11	0,10	90	92	32	34	134	129
				B				
	0,73	0,72	67	70	81	78	570	582
	0,74	0,73	58	64	120	100	549	567
	0,61	0,60	69	74	120	110	541	554
	0,58	0,57	89	101	58	62	626	638
Media	0,66	0,66	71	77	95	87	571	585

Din datele trecute în tabela 2 se constată că muşchii imersaţi în soluţie Ringer cu un conţinut de 10—50 mM/l KCl conţin o cantitate de apă totală mai mică decît muşchii-martor imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik. Deshidratarea muşchilor este practic proporţională cu creşterea concentraţiei KCl în mediul de imersiune.

Rezultatele noastre diferă de cele ale lui Briner şi colab. [19], care nu înregistrează modificări de volum la muşchii sartorius de broaşte *Buffo* imersaţi în soluţie Ringer cu adaos de KCl. Ele concordă însă cu

Tabela 2

Conținutul în apă totală a mușchilor gastrocnemieni de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de KCl

Mușchi tratat cu KCl = K
Mușchi-martor = M

Greutatea mușchilor g		Concentrația KCl, mM/l	Apa totală g/g de substanță uscată		Diferența g/g de substanță uscată
M	K		M	K	K−M
0,42	0,43	0	3,93	4,01	+0,08
0,51	0,51	0	4,12	4,22	+0,10
0,45	0,46	0	4,06	4,13	+0,07
0,41	0,40	0	4,00	4,09	+0,09
Media 0,45	0,45		4,03	4,11	+0,08
0,53	0,53	10	5,50	5,40	−0,10
0,43	0,44	10	4,19	4,12	−0,07
0,44	0,44	10	3,83	3,78	−0,05
0,47	0,46	10	5,57	5,47	−0,10
Media 0,47	0,47		4,77	4,69	−0,08
0,39	0,38	20	4,81	4,70	−0,11
0,40	0,41	20	4,04	3,84	−0,20
0,51	0,51	20	4,75	4,59	−0,16
0,41	0,40	20	4,47	4,28	−0,19
Media 0,43	0,42		4,52	4,35	−0,17
0,46	0,45	50	4,96	4,53	−0,43
0,59	0,60	50	4,47	4,40	−0,47
0,60	0,58	50	4,66	4,24	−0,42
0,48	0,47	50	4,52	4,16	−0,36
Media 0,53	0,52		4,65	4,23	−0,42

datele publicate de alți cercetători, după care cantitatea relativă a apei totale a mușchiului [29], [30] sau a altor organe [31]—[33] este dependentă de osmolaritatea mediului înconjurător.

Din aceeași tabelă se observă că mușchii imersați în soluție Ringer-Jendrassik fără K^+ conțin o cantitate de apă totală ușor crescută față de cea din mușchii imersați în soluție Ringer-Jendrassik.

Din tabela 3 se constată că, atît la mușchiul sartorius, cît și la cel gastrocnemian, adaosul de KCl în concentrațiile de 20 și 50 mM/l, cu scăderea unei cantități osmotic echivalente a Na^+, determină o creștere a cantității de apă totală proporțională cu concentrația KCl. Rezultate similare au fost semnalate de Show și colab. [1] pe mușchi sartorius de broască *Buffo*.

Rezultatele noastre concordă cu indicația că celulele multor țesuturi își măresc volumul cînd sînt plasate în soluții a căror presiune osmotică este similară lichidelor extracelulare normale [34].

Tabela 3

Conţinutul în apă totală a muşchilor sartorius şi gastrocnemieni de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik cu adaos de KCl pe seama unei cantităţi osmotic echivalente a Na+

A = muşchi sartorius
B = muşchi gastrocnemian

Muşchi tratat cu KCl=K
Muşchi-martor = M

Greutatea muşchilor g		Concentraţia KCl, mM/l	Apă totală g/g de substanţă uscată		Diferenţa g/g de substanţă uscată
M	K		M	K	
		A			
0,15	0,15	20	4,77	5,06	+0,29
0,14	0,13	20	5,00	5,31	+0,31
0,12	0,13	20	4,42	4,72	+0,32
0,18	0,17	20	5,26	5,50	+0,24
Media 0,15	0,14		4,86	5,15	+0,29
0,09	0,11	50	5,52	5,94	+0,42
0,13	0,14	50	5,12	5,59	+0,47
0,19	0,20	50	4,24	4,88	+0,58
0,16	0,15	50	4,92	5,45	+0,53
Media 0,14	0,15		4,95	5,46	+0,50
		B			
0,55	0,55	20	3,98	4,18	+0,18
0,32	0,33	20	5,02	5,17	+0,15
0,42	0,41	20	4,38	4,58	+0,20
0,50	0,50	20	4,67	4,92	+0,25
Media 0,45	0,45		4,51	4,71	+0,20
0,60	0,60	50	4,21	4,71	+0,50
0,58	0,57	50	3,68	4,11	+0,43
0,44	0,45	50	4,85	5,40	+0,54
0,38	0,37	50	4,43	4,91	+0,48
Media 0,50	0,50		4,29	4,78	+0,49

Tabelele 4 şi 5 arată că omiterea K^+ din mediul de imersiune nu modifică conţinutul şi exosmoza acidului lactic la muşchiul sartorius şi gastrocnemian. Se confirmă observaţia făcută de alţi autori că absenţa K^+ din mediul de imersiune nu induce modificări metabolice importante la muşchi [5]. Clausen [35] însă semnalează o apreciabilă scădere a conţinutului în acid lactic al muşchiului diafragmic de şobolan ca urmare a omiterei K^+ din mediul de imersiune.

KCl în concentraţiile de 10, 20, respectiv 50 mM/l determină o scădere evidentă a conţinutului în acid lactic al muşchilor sartorius şi gastrocnemieni (tabelele 4 şi 5). În evaluarea rezultatelor am avut în vedere modificările de greutate ale muşchilor, corespunzătoare fiecărei concentraţii de KCl.

Rezultatele noastre diferă de cele ale lui Hegnauer şi colab. [18] şi Muller şi Simon [5], care observă stimularea glicolizei musculare la

Tabela 4

Conținutul și exosmoza acidului lactic la mușchii sartorius de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de cantități diferite de KCl

Mușchi tratat cu KCl = K
Mușchi-martor = M

	Greutatea mușchilor g		Concentrația KCl, mM/l	Acid lactic în mușchi mg/100 g de țesut umed		Acid lactic exosmozat, µg		Acid lactic produs în timpul experienței µg/mușchi	
	M	K		M	K	M	K	M	K
	0,13	0,13	0	84	79	60	72	169	175
	0,13	0,14	0	78	70	55	70	172	168
	0,10	0,10	0	85	90	29	24	124	114
	0,09	0,09	0	87	80	47	42	125	114
Media	0,12	0,11		83	79	48	52	148	143
	0,15	0,14	10	121	90	73	78	254	204
	0,13	0,13	10	127	95	90	95	255	218
	0,14	0,13	10	78	63	53	60	162	142
	0,14	0,14	10	98	70	50	60	187	158
Media	0,14	0,14		106	79	66	73	214	180
	0,14	0,15	20	109	59	79	103	231	191
	0,14	0,15	20	99	66	100	108	238	207
	0,16	0,17	20	98	63	83	109	240	216
	0,14	0,14	20	100	61	77	102	217	187
Media	0,14	0,15		101	62	85	105	231	200
	0,11	0,12	50	89	17	81	121	179	140
	0,11	0,11	50	99	21	86	94	194	117
	0,09	0,10	50	105	12	84	77	178	88
	0,14	0,15	50	92	11	97	116	226	132
Media	0,11	0,12		96	15	87	102	194	119

adaosul ionilor de K^+ în mediul extern, și nu concordă nici cu indicația că hiperosmolaritatea ar stimula catabolizarea glucozei în mușchi [25], [26].

De menționat este faptul că, în ciuda conținutului scăzut în acid lactic al mușchilor sub influența K^+, exosmoza acestuia este crescută față de martor, ceea ce indică o creștere semnificativă a permeabilității membranei musculare pentru acidul lactic.

Tabela 6 cuprinde date care arată că K^+ în soluție izotonică determină, ca și în cazul soluției hipertonice, scăderea conținutului în acid lactic la mușchii sartorius și gastrocnemieni, scădere proporțională și în acest caz cu creșterea concentrației de KCl. Exosmoza acidului lactic este, ca și în cazul soluției Ringer hipertonice, crescută (tabelele 4 și 5).

Rezultă că ionul K^+ adăugat mediului de imersiune atît în soluție hipertonică, cît și izotonică a mușchiului sartorius și gastrocnemian de broască determină o scădere evidentă a conținutului în acid lactic al celor doi mușchi. Acest fapt s-ar putea datori difuziei unor enzime glicolitice în mediul de imersiune, ca și în cazul mușchiului diafragmic de

Tabela 5

Conţinutul şi exosmoza acidului lactic la muşchii gastrocnemieni de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassik cu adaos de cantităţi diferite de KCl

Muşchi tratat cu KCl = K
Muşchi-martor = M

Greutatea muşchilor, g			Concentraţia KCl mM/l	Acid lactic în muşchi mg/100 g de ţesut umed		Acid lactic exosmozat, µg		Acid lactic produs în timpul experienţei µg/muşchi	
M		K		M	K	M	K	M	K
	0,62	0,63	0	62	63	145	160	529	556
	0,67	0,67	0	55	49	182	170	550	498
	0,47	0,47	0	80	75	154	145	530	497
	0,70	0,69	0	50	55	139	129	479	508
Media	0,61	0,61		62	60	155	151	522	515
	0,63	0,63	10	65	44	231	231	640	508
	0,42	0,42	10	86	75	123	104	484	419
	0,67	0,65	10	41	26	115	115	390	284
	0,61	0,61	10	44	28	105	107	373	277
Media	0,58	0,58		59	43	144	139	472	372
	0,38	0,38	20	47	11	80	90	259	132
	0,37	0,37	20	50	25	72	80	257	172
	0,31	0,31	20	38	15	95	110	213	156
	0,35	0,35	20	35	15	92	104	214	156
Media	0,35	0,35		42	17	85	96	236	154
	0,33	0,34	50	71	17	106	126	340	184
	0,34	0,34	50	55	20	102	122	320	190
	0,39	0,40	50	25	2	100	123	203	131
	0,40	0,39	50	58	2	96	121	328	129
Media	0,36	0,36		52	10	101	123	298	159

şobolan [36], difuzie care este accentuată la adaosul în mediu a ionilor de K^+ [37].

Scăderea conţinutului în acid lactic ar mai putea fi rezultatul unei creşteri a catabolizării lactatului sau unei inhibări a unor enzime glicolitice.

Efectul K^+ asupra conţinutului în acid lactic este similar celui produs asupra acidului piruvic, ceea ce relevă strînsa legătură dintre metabolismul anaerob şi cel aerob sub influenţa K^+.

CONCLUZII

1. Omiterea K^+ din mediul de imersiune al muşchilor sartorius şi gastrocnemian de broască determină o uşoară creştere a cantităţii de apă totală.

2. Absenţa ionului de K^+ nu produce modificări în conţinutul şi exosmoza acidului lactic la muşchii menţionaţi.

3. Ionul de K^+ adăugat mediului de imersiune al muşchilor sartorius şi gastrocnemian de broască determină : a) în soluţie hipertonică,

Tabela 6

Conținutul și exosmoza acidului lactic la mușchii sartorius și gastrocnemieni de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de KCl pe seama unei cantități osmotic echivalente a Na+

A = mușchi sartorius
B = mușchi gastrocnemian

Mușchi tratat cu KCl = K
Mușchi-martor = M

Greutatea mușchilor, g		Concentrația KCl, mM/l	Acid lactic în mușchi mg/100 g de țesut umed		Acid lactic exosmozat, µg		Acid lactic produs în timpul experienței, µg/mușchi	
M	K		M	K	M	K	M	K
			A					
0,14	0,13	20	49	35	66	58	132	103
0,13	0,13	20	73	45	59	79	154	137
0,10	0,10	20	67	32	99	104	186	156
0,14	0,14	20	77	39	48	75	156	130
Media 0,13	0,13		67	38	68	79	158	134
0,11	0,12	50	98	18	73	90	181	116
0,12	0,12	50	53	14	92	100	156	117
0,10	0,11	50	62	30	60	65	122	98
0,13	0,13	50	58	13	70	78	145	95
Media 0,11	0,12		68	19	74	83	151	107
			B					
0,32	0,31	20	59	40	97	109	286	233
0,42	0,42	20	64	40	99	104	365	272
0,53	0,52	20	53	33	89	98	369	270
0,34	0,34	20	48	36	100	105	263	227
Media 0,40	0,40		56	37	96	104	321	250
0,50	0,50	50	77	41	70	81	455	286
0,62	0,63	50	74	50	85	88	543	403
0,50	0,49	50	63	25	86	103	401	225
0,68	0,68	50	73	43	90	100	586	392
Media 0,57	0,57		72	40	83	93	496	326

o scădere evidentă a conţinutului în apă totală al muşchilor, proporţională cu creşterea concentraţiei de KCl din mediu ; b) în soluţie izotonică, o creştere semnificativă a conţinutului lor de apă totală, de asemenea proporţională cu concentraţia KCl din mediu.

4. Ionul de K^+ adăugat mediului de imersiune atît în soluţie hipertonică, cît şi izotonică determină la muşchii sartorius şi gastrocnemieni : a) o scădere evidentă a conţinutului lor în acid lactic, proporţională cu creşterea concentraţiei KCl ; b) creşterea permeabilităţii membranei musculare pentru difuzia acidului lactic, de asemenea proporţională cu concentraţia KCl din mediu.

Prezentat la redacţie la 28 aprilie 1972

Institutul de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. F. H. Show, S. E. Simon, B. M. Johnstone, M. E. Holman, J. Gen. Physiol., **40**, 263 (1956).
2. B. Boyle, E. J. Conway, J. Physiol., **100**, 1 (1941).
3. H. Kusel, H. Netter, Biochem. Z., **323**, 39 (1952).
4. G. Lukowsky, H. Netter, Biochem Z., **323**, 53 (1952).
5. M. Muller, S. E. Simon, Biochim. Biophys. Acta, **37**, 107 (1960).
6. I. Adriani, Am. Med. Expt. Biol. Fernae, **34**, 26 (1956).
7. H. J. Curtis, K. S. Cole, J. Cell. Comp. Physiol., **19**, 135 (1942).
8. G. W. Ling, R. W. Gerard, J. Cell. Comp. Physiol., **34**, 283 (1949).
9. W. L. Nastuk, A. Hodgkin, J. Cell. Comp. Physiol., **42**, 427 (1953).
10. H. P. Jenerick, J. Cell. Comp. Physiol, **34**, 383 (1949).
11. C. Edwards, E. J. Harris, J. Physiol., **135**, 567 (1957).
12. R. D. Keynes, Proc. Roy. Soc. (London) B, **142**, 359 (1954).
13. E. J. Harris, J. Gen. Physiol., **41**, 169 (1957).
14. D. Y. Solandt, J. Physiol., **86**, 162 (1936).
15. A. V. Hill, J. V. Howarth, Proc. Roy. Soc. (London), **B 147**, 21 (1957).
16. L. Lundholm, T. Rall, N. Vernos, Acta Physiol. Scand., **70**, 127 (1967).
17. I. Navatny, F. Yuskicil, L. Yyklicky, R. Beranek, Physiol. Bohemoslov, **11**, 277 (1962).
18. A. H. Hegnauer, W. O. Fenn, D. M. Cobb, J. Cell. Comp. Physiol., **4**, 505 (1934).
19. G. P. Briner, S. E. Simon, R. Frater, P. Tasker, Biochim. Biophys. Acta, **35**, 485 (1959).
20. F. Kahmar, P. D. Boyer, J. Biol. Chem., **200**, 669 (1953).
21. I. C. Fratantoni, A. Askari, Biochim. Biophys. Acta, **99**, 259 (1965).
22. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **15**, 93 (1972).
23. I. Sacks, R. V. Ganslen, I. T. Difée, Am. J. Physiol., **177**, 133 (1964).
24. S. F. Carson, J. W. Foster, W. E. Jefferson, E. P. Phars, D. S. Antony, Arch. Biochem. Physiol., **33**, 448 (1951).
25. T. Kuzuya, E. Samols, R. H. Williams, J. Biol. Chem., **240**, 2227 (1965).
26. T. Clausen, Biochim. Biophys. Acta, **150**, 56 (1968).
27. L. Jendrassik, L. Faiszt, Rolando Eötvos nominatae, Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
28. S. B. Barker, W. A. Summerson, J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941).
29. V. I. Stabrovskaya, N. M. Nastretayeva, A. D. Brown, Citologia, **9**, 1137 (1970).
30. Y. V. Nastchin, Zh. Obsch. Biol., **27**, 473 (1966).
31. E. Cotlier, B. Kwan, C. Beaty, Biochim., Biophys. Acta, **150**, 705 (1968).
32. I. A. Karclay, E. J. Hambert, R. White, Biochem. J., **80**, 9P (1961).
33. A. Kleizeller, I. Nadvitkova, A. Kotkova, Biochim., Biophys. Acta, **135**, 286 (1967).
34. S. E. Simon, F. H. Show, S. Benett, M. Muller, J. Gen. Physiol., **40**, 753 (1957).
35. T. Clausen, Biochim., Biophys. Acta, **120**, 361 (1966).
36. K. L. Zierler, R. Leavy, R. Anders, Bull. Johns. Hopkins Hosp., **92**, 7 (1953).
37. K. L. Zierler, Am. j. Physiol., **185**, 1 (1956).

THE EFFECT OF POTASSIUM IONS UPON PERMEABILITY, TOTAL WATER AND LACTIC ACID CONTENT OF FROG SARTORIUS AND GASTROCNEMIAN MUSCLES

SUMMARY

Potassium ions introduced in the immersion medium of frog sartorius and gastrocnemian muscles induce, either in hypertonic or isotonic solution an evident decrease in lactic acid content; this decrease is proportional to the increase in the potassium chloride concentration. K^+ also produces an increase in the permeability of muscle membrane for the diffusion of lactic acid in the immersion medium. K^+ in hypertonic or isotonic solution determines a decrease, respectively an increase in the content of total water of muscles.

The absence of potassium ions from the immersion medium, increases slowly the water content, without affecting the content and exosmosis of lactic acid.

The effect of K^+ upon lactic acid is similar to that produced upon pyruvic acid; this fact releaves the relationship between the anaerob and aerob metabolism, under the influence of K^+.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 299–304 (1972)

ELIBERAREA FOSFATAZEI ACIDE DIN BIOSTRUCTURA PLANTULELOR DE PORUMB ÎN FUNCȚIE DE CONCENTRAȚIA INHIBITORILOR METABOLICI

R. STĂNESCU

Rezumat. — S-a cercetat eliberarea fosfatazei acide din frunzele plantulelor de porumb în urma tratamentului cu inhibitori metabolici în concentrații diferite. Enzima se găsește atît în biostructură, cît și în lichidul vacuolar al plantulelor, iar eliberarea ei se face progresiv în funcție de creșterea concentrației inhibitorilor.

Cercetări recente în lumina teoriei biostructurii [1] au arătat că unii inhibitori metabolici, introduși în plantulele de porumb în doze nemortale prin metoda absorbției [2], [3] sau prin metoda vacuum-infiltrației [4], destramă parțial biostructura și eliberează o parte din apa asimilată, împreună cu unele substanțe și ioni hidrosolubili. Sucul care se obține prin stoarcerea frunzelor vii, reprezentînd apa liberă din plantă împreună cu substanțele care se găsesc dizolvate în ea, este numit convențional în teoria biostructurii „suc vacuolar". În urma tratamentului cu inhibitori metabolici, se obține prin stoarcere o cantitate sporită de suc, deoarece la sucul vacuolar se adaugă o parte din apa biostructurată, ca și unele dintre componentele biostructurii.

Dintre acestea, fosfataza acidă a fost studiată cu privire la repartiția ei în biostructură și sucul vacuolar pe varză [5] în condițiile omorîrii materialului, ajungîndu-se la concluzia că în fruntele de varză fosfataza acidă se găsește atît în sucul vacuolar, cît și în biostructură.

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim variația activității fosfatazei acide în sucurile obținute din frunzele plantulelor de porumb, tratate cu unii inhibitori metabolici în doze nemortale și în concentrații diferite.

Este de așteptat ca enzima să se găsească atît în sucul vacuolar, cît și în biostructura plantulelor de porumb, iar eliberarea ei să se facă proporțional cu creșterea concentrației inhibitorilor.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările le-am efecuat pe frunze de plantule de porumb (hibrizi simpli 301 și 330), crescute în condiții de seră, în vîrstă de 14—20 de zile. Plantulele se tăiau de la nivelul solului, se grupau în mănunchiuri

de cîte 10 g şi tulpinile se introduceau în soluţii de inhibitori, zaharoză sau apă bidistilată. După 24 de ore tulpinile se spălau cu apă bidistilată, se ştergeau cu hîrtie de filtru şi, după verificarea greutăţii mănunchiului, se storceau cu ajutorul unei prese manuale de construcţie proprie pentru cantităţi mici de material foliar la o presiune de aproximativ 50 atm, pînă ce materialul nu mai ceda suc (8—10 min). Ca inhibitori am folosit azida de sodiu în concentraţia 10^{-2} M (0,650 g/l) şi 2,4-dinitrofenol în concentraţia 10^{-3} M (0,184 g/l), dar şi soluţii mai diluate, şi anume pentru azidă 0,434, 0,325 şi 0,217 g/l, iar pentru 2,4-dinitrofenol 0,123, 0,092 şi 0,061 g/l. Ca substanţă fără acţiune asupra biostructurii am folosit zaharoza în concentraţia 10^{-2} M (3,42 g/l), iar martorul a fost ţinut în apă bidistilată.

Sucul obţinut prin presare a fost colectat într-o fiolă, măsurarea volumului făcîndu-se prin pipetare. Lichidul se centrifuga la 3 000 rot/min timp de 10 min, după care se determina indicele de refracţie, activitatea fosfatazei acide şi fosforul anorganic prin metoda Fiske-Subarov-Ignatiev [6], folosind tamponul acid acetic-acetat de sodiu pentru realizarea pH-ului de 4,6 şi soluţia de β-glicerofosfat de sodiu ca substrat al enzimei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt centralizate datele obţinute pentru plantulele de porumb tratate cu azidă în concentraţie 0,650 g/l şi dinitrofenol în concentraţie 0,184 g/l. Volumul sucului obţinut de la plantulele tratate cu azidă depăşeşte cu de peste trei ori volumul martorului şi de peste două ori pe cel obţinut în cazul tratamentului cu dinitrofenol.

Indicii de refracţie ai sucurilor obţinute din plantulele tratate cu inhibitori au valori ceva mai mari decît martorul, dar, dacă se exprimă concentraţia acestor sucuri, convenţional, în grame de zaharoză (reprezentînd cantitatea totală de substanţe dizolvate), se constată o creştere de peste cinci ori a concentraţiei sucului obţinut în cazul tratamentului cu azidă şi de peste trei ori pentru dinitrofenol. Această creştere a concentraţiei este datorită eliberării din biostructură sub influenţa inhibitorilor a substanţelor hidrosolubile.

Activitatea fosfatazei acide este crescută în cazul tratamentului cu inhibitori: pentru azidă 130 γP, iar pentru dinitrofenol 122,5 γP, comparativ cu martorul 78,4 γP. Aceste valori arată că fosfataza acidă se găseşte în plantulele de porumb atît în lichidul vacuolar, cît şi în biostructură. Fosforul anorganic prezintă valori crescute, şi anume 1,30 mg P în cazul tratamentului cu azidă 0,73 mg P în cazul tratamentului cu dinitrofenol, faţă de martor 0,20 mg P, valori ceva mai mari decît cele semnalate de alţi autori.

Am dozat aceleaşi componente în sucurile plantulelor de porumb tratate cu soluţii mai diluate de inhibitori; acest aspect al relaţiei dintre concentraţia inhibitorilor introduşi în plantule şi activitatea metabolică a sucului obţinut a fost studiat mai puţin.

Tabela 1

Volumul (ml), indicele de refracţie, concentraţia globală (g zaharoză), activitatea fosfatazei acide (γP), fosforul anorganic (γ sau mgP), pentru sucurile plantulelor de porumb, martor sau tratate cu sol. de NaN_3 (0,650 g/l) şi DNP (0,184 g/l)

Indicele determinat şi varianta	Nr. crt.					Media
	1	2	3	4	5	
Suc (ml) stors din 10 g de frunze						
Martor	1,7	1,8	1,8	1,7	1,5	1,7
NaN_3	5,6	5,8	5,7	5,6	5,4	5,6
DNP	4,1	4,1	4,2	4,0	3,8	4,0
Indice de refracţie (n_D)						
Martor	1,3366	1,3365	1,3368	1,3370	1,3371	1,3368
NaN_3	1,3392	1,3390	1,3390	1,3394	1,3398	1,3393
DNP	1,3380	1,3380	1,3378	1,3382	1,3384	1,3381
Zaharoză totală (g)						
Martor	0,040	0,043	0,045	0,046	0,041	0,043
NaN_3	0,236	0,234	0,230	0,245	0,251	0,239
DNP	0,139	0,129	0,136	0,140	0,138	0,136
Activ. enzim (γP) din 1 ml suc						
Martor	50	46	39	44	53	46,4
NaN_3	24	20	22	22	28	23,2
DNP	30	32	26	30	34	30,4
Activ. enzim. (γP) din 10 g frunze						
Martor	85	82,8	70,2	74,8	79,5	78,4
NaN_3	134,4	116	125,4	123,2	151,2	130
DNP	123	131,2	109,2	120	129,2	122,5
P anorg. (γP) din 1 ml suc						
Martor	126	134	130	120	128	127,6
NaN_3	218	220	240	245	232	231
DNP	168	186	180	175	198	181,4
P anorg. (mg P) din 10 g frunze						
Martor	0,21	0,24	0,23	0,20	0,19	0,214
NaN_3	1,22	1,28	1,37	1,37	1,25	1,298
DNP	0,69	0,76	0,76	0,70	0,75	0,732

În tabelele 2 şi 3 sînt prezentate aceste date. Se constată că, pe măsură ce concentraţia inhibitorilor se micşorează, se obţin valori din ce în ce mai mici atît pentru volumul sucului stors, cît şi pentru concentraţia lui globală, fosfataza acidă şi fosforul anorganic, dar superioare martorului.

În cazul tratamentului cu azidă, valorile sînt mai mari decît în cazul tratamentului cu dinitrofenol, iar variaţia datelor este mai bruscă pe măsură ce concentraţia inhibitorilor se micşorează. Aceasta se explică poate prin concentraţia mai mare a soluţiei de azidă (10^{-2} M faţă de 10^{-3} M) sau prin pătrunderea în plantulă a ionilor de sodiu din azidă.

În cazul tratamentului cu zaharoză (substanţă cunoscută ca fiind fără acţiune asupra biostructurii) [1], [4], datele obţinute, fiind asemă-

Tabela 2

Volumul (ml), indicele de refracție și concentrația globală (g zaharoză) a sucurilor plantulelor de porumb martor sau tratate cu sol. de NaN_3 și DNP

Indicele determinat și varianta	Nr. crt.					Media
	1	2	3	4	5	
Suc (ml) stors din 10 g frunze						
Martor	1,7	1,8	1,8	1,7	1,5	1,7
NaN_3 0,434 g/l	4,7	4,9	5,2	4,6	4,2	4,7
NaN_3 0,325 g/l	4,1	4,5	4,8	4,3	3,8	4,3
NaN_3 0,217 g/l	3,4	3,7	3,9	3,3	2,7	3,4
DNP 0,123 g/l	3,3	3,6	3,5	3,3	2,9	3,3
DNP 0,092 g/l	2,8	3,2	3,0	2,7	2,3	2,8
DNP 0,061 g/l	2,6	3,1	3,0	2,5	2,4	2,7
Indice de refracție (n_D)						
Martor	1,3366	1,3365	1,3368	1,3370	1,3371	1,3368
NaN_3 0,434 g/l	1,3386	1,3382	1,3381	1,3388	1,3389	1,3385
NaN_3 0,325 g/l	1,3383	1,3380	1,3379	1,3386	1,3386	1,3383
NaN_3 0,217 g/l	1,3380	1,3378	1,3375	1,3386	1,3388	1,3381
DNP 0,123 g/l	1,3380	1,3379	1,3378	1,3382	1,3385	1,3381
DNP 0,092 g/l	1,3378	1,3375	1,3375	1,3380	1,3381	1,3378
DNP 0,061 g/l	1,3378	1,3372	1,3375	1,3378	1,3380	1,3377
Zaharoză totală (g)						
Martor	0,040	0,043	0,045	0,046	0,041	0,043
NaN_3 0,434 g/l	0,178	0,172	0,179	0,180	0,167	0,175
NaN_3 0,325 g/l	0,146	0,152	0,158	0,163	0,144	0,152
NaN_3 0,217 g/l	0,115	0,120	0,191	0,125	0,106	0,117
DNP 0,123 g/l	0,112	0,119	0,113	0,116	0,108	0,113
DNP 0,092 g/l	0,091	0,097	0,091	0,091	0,079	0,090
DNP 0,061 g/l	0,084	0,088	0,091	0,081	0,081	0,086

nătoare cu cele pentru probele-martor, nu au mai fost incluse în tabele; într-adevăr, zaharoza, în concentrația folosită, nu destramă biostructura, ea găsindu-se frecvent în celula vegetală.

Folosind pentru determinări fie HS 301, fie HS 330, datele obținute au fost apropiate : inhibitorii folosiți exercită aceeași influență, indiferent de felul hibridului.

Rezultatele experimentale obținute dovedesc că inhibitorii metabolici introduși în plantulele de porumb în doze nemortale prin metoda absorbției provoacă destrămarea parțială a materiei biostructurate, cu eliberarea de apă și unele componente hidrosolubile, printre care și fosfataza acidă, care se găsește atît în biostructură, cît și în lichidul vacuolar al plantulelor de porumb.

Tabela 3

Activitatea fosfatazei acide (γP) şi a fosforului anorganic (γ sau mg P) în sucurile plantulelor de porumb martor sau tratate cu sol. de NaN_3 şi DNP

Indicele determinat şi varianta	Nr. crt.					Media
	1	2	3	4	5	
Activ. enzim. (γP) din 1 ml suc						
Martor	50	46	39	44	53	46,4
NaN_3 0,434 g/l	26	24	22	26	30	25,6
NaN_3 0,325 g/l	27	25	22	25	30	25,9
NaN_3 0,217 g/l	30	28	24	30	35	29,4
DNP 0,123 /l	35	33	30	36	36	34
DNP 0,092 g/l	33	30	32	40	40	35
DNP 0,061 g/l	33	30	28	38	36	33
Activ. enzimei (γP) din 10 g frunze						
Martor	85	82,8	70,2	74,8	79,5	78,4
NaN_3 0,434 g/l	122,2	117,6	114,4	119,6	126,0	119,9
NaN_3 0,325 g/l	110,7	112,5	105,6	107,5	114	110
NaN_3 0,217 g/l	100,2	103,6	93,6	99	94,5	98,2
DNP 0,123 g/l	115,5	118,8	105	118,8	104,4	112,5
DNP 0,092 g/l	92,4	96	96	108	92	96,9
DNP 0,061 g/l	85,8	93	84	95	86,4	88,8
P anorg. (γP) din 1 ml suc						
Martor	126	134	130	120	128	127,6
NaN_3 0,434 g/l	216	225	208	220	232	220,2
NaN_3 0,325 g/l	206	200	208	220	235	213,8
NaN_3 0,217 g/l	192	180	172	178	190	182,4
DNP 0,123 g/l	184	180	192	190	198	188,8
DNP 0,092 g/l	176	170	160	180	190	175,2
DNP 0,061 g/l	164	170	160	175	180	169,8
P anorg. (mg P) din 10 g frunze						
Martor	0,21	0,24	0,23	0,20	0,19	0,21
NaN_3 0,434 g/l	1,02	1,10	1,08	1,01	0,97	1,04
NaN_3 0,325 g/l	0,84	0,90	1,0	0,95	0,89	0,92
NaN_3 0,217 g/l	0,65	0,67	0,67	0,59	0,51	0,62
DNP 0,123 g/l	0,61	0,65	0,67	0,63	0,57	0,63
DNP 0,092 g/l	0,49	0,54	0,48	0,45	0,46	0,48
DNP 0,061 g/l	0,43	0,53	0,48	0,44	0,43	0,46

Eliberarea enzimei se face progresiv, în funcţie de creşterea concentraţiei inhibitorilor.

Prezentat la redacţie la 26 aprilie 1972

Universitatea Bucureşti,
Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Biostructura*, Bucureşti, Edit. Academiei, 1969.
2. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
3. V. Elefterescu, St. cerc. biochim., **13**, 261 (1970).

4. M. Rabega, St. cerc. biochim., **14**, 425 (1971).
5. E. Macovschi, V. Frunzeti, Rev. Roum. biochim., **5**, 165 (1968).
6. C. Fiske, V. Subarov, J. biol. chem., **66**, 375 (1926).

RELEASE OF THE ACID PHOSPHOMONOESTERASE FROM THE BIOSTRUCTURE OF MAIZE SEEDLINGS DEPENDING ON THE CONCENTRATION OF INHIBITORS

SUMMARY

The release of phosphomonoesterase from the leaves of maize seedlings was reserached after the treatment with metabolic inhibitors in various concentrations.

The enzyme may be found both in the biostructure and in the vacuolar juice, its release is progressive depending on the increase in the concentration of inhibitors.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 305–310 (1972)

SINTEZA DE PROTEINE ŞI NIVELUL ACIZILOR NUCLEICI ÎN FELII DE FICAT, SUB ACŢIUNEA PROTECTOARE A ACIDULUI L-ASPARTIC

ANTONIA SUCIU şi R. IENCICA

Rezumat. — Se studiază acţiunea acidului L-aspartic asupra sintezei de proteine în felii de ficat incubate în mediu Krebs-Ringer fosfat la 37,5° C timp de 4 ore. Paralel s-a urmărit şi comportarea acizilor nucleici şi a nucleotidelor tisulare, precum şi eliberarea de proteine şi de nucleotide libere în mediul de incubare. Sub influenţa acidului aspartic se constată o creştere semnificativă a sintezei proteinelor endocelulare şi mai puţin a celor de export. Asupra acizilor nucleici acidul aspartic exercită, în condiţiile experimentului, un efect protector, care constă, probabil, în frînarea depolimerizării.

Cercetările clinice şi experimentale asupra rolului hepatoprotector al acidului aspartic au demonstrat constant efectul său de stimulare a regenerării hepatice prin participarea acestui aminoacid la sinteza de nucleotide purinice şi pirimidinice, prin intervenţia lui în ciclul Krebs-Henseleit şi prin producerea de oxalacetat în urma reacţiei de transaminare [1], [2], [7]—[9].

Evidenţa sintezei de albumină în ficat s-a conturat acum trei decenii, în urma cercetărilor experimentale pe cîini cu shunt porto-cav [14]. Studii ulterioare, efectuate *in vivo* şi *in vitro*, au precizat rolul specific al ficatului în sinteza de albumină [12], [17], [19]—[22], [25].

În lucrarea de faţă ne-am propus să studiem acţiunea acidului L-aspartic asupra sintezei de proteine în feliile de ficat incubate *in vitro* şi comportarea paralelă a acizilor nucleici şi a nucleotidelor acido-solubile.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat cu ficat de şobolani albi, masculi, în greutate de 120—150 g, menţinuţi în aceleaşi condiţii de mediu şi de alimentaţie şi flămînziţi 24 de ore înainte de sacrificare. Ficatul prelevat a fost imediat perfuzat cu soluţie de NaCl 0,15 M tamponată la pH = 7,4 şi răcită la 2—4°C pentru înlăturarea balastului proteinelor plasmatice. Feliile s-au secţionat în cameră umedă şi răcită la o grosime de aproximativ 0,3 mm. Incubarea s-a realizat în mediu Krebs-Ringer fosfat, pH = 7,4 şi cu oxigen pur în faza gazoasă [6], [11], [15]. La 10 ml de mediu Krebs-Ringer fosfat s-au adăugat 10 μmoli de glucoză p.a. şi 500 mg de felii de ficat.

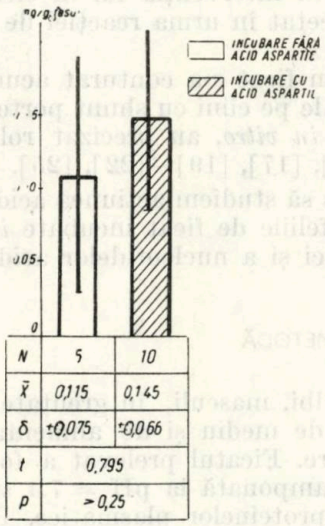
Experienţele s-au efectuat în două serii paralele, şi anume: a) felii de ficat în mediu de incubare cu glucoză şi adaos de 10 μmoli de acid. L-aspartic la 1 g de ficat; b) felii de ficat în mediul de incubare cu glucoză fără adaos de aminoacid. Durata incubării a fost de 4 ore, la temperatura constantă de 37,5°C şi cu agitaţie blîndă.

Din lichidul de incubare s-au recoltat probe de cîte 0,10 ml la timpul 0 şi la intervale de 1 oră pentru a surprinde dinamic diferenţele maxime. În aceste probe s-au determinat proteinele solubile şi nucleotidele acido-solubile. Din ţesutul iniţial şi din cel incubat 4 ore s-au dozat proteinele, acizii nucleici şi nucleotidele totale acido-solubile.

Proteinele s-au determinat după metoda Lowry [13], luînd drept standard o soluţie de albumină bovină cristalină. Acizii nucleici au fost extraşi după metoda Schneider [23] şi evaluaţi după absorbţia la 260 mμ. Aceeaşi bandă de absorbţie s-a folosit şi pentru aprecierea conţinutului de nucleotide acido-solubile. Acizii nucleici s-au exprimat în mg, iar nucleotidele în unităţi de extincţie (UE) pe g de ţesut (4). Mediul de incubare a fost centrifugat la sfîrşitul experimentului, iar din supernatantul liofilizat s-au executat separări electroforetice în gel-agar.

REZULTATE

Rata medie a eliberării de proteine de „secreţie" în lichidul de incubare pe g de ţesut şi pe oră nu diferă semnificativ ($p > 0{,}25$) în probele incubate cu aspartat ($0{,}145 \pm 0{,}066$ mg/g de ţesut/oră) în comparaţie cu cele incubate fără aminoacid ($0{,}115 \pm 0{,}075$ mg/g de ţesut/oră) (fig. 1).



N	5	10
$\bar{x}$	0,115	0,145
δ	±0,075	±0,066
t	0,795	
p	>0,25	

Fig. 1. — Proteine eliberate în mediul de incubare de 1 g de ţesut într-o oră.

Electroforeza liofilizatului proteinic provenit din mediul de incubare prezintă o fracţiune unică în zona de migrare anodică a albuminei (fig. 2), constatare analogă cu cele consemnate în literatură [20], [21]. Nivelul

proteinelor tisulare la sfîrșitul celor 4 ore de incubare este diferit, în funcție de prezența sau de absența acidului L-aspartic : în probele cu aminoacid apare o creștere semnificativă ($p < 0{,}01$) a proteinelor tisulare față de

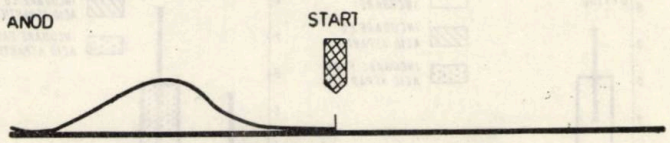
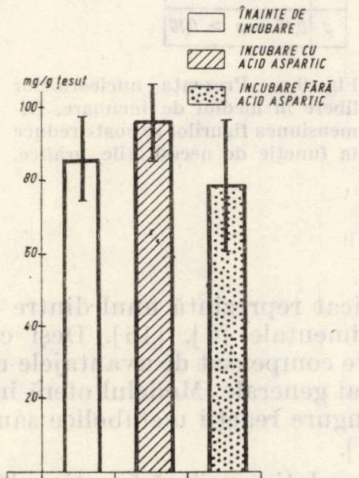


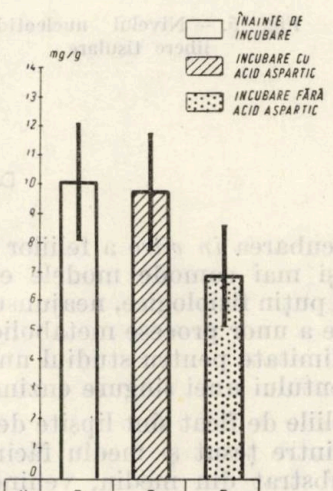
Fig. 2. — Electroforeza lichidului de incubare.

țesutul inițial neincubat ($95{,}33 \pm 10{,}89$ mg/g de țesut, respectiv $85{,}52 \pm 12{,}5$ mg/g de țesut, fig. 3) ; diferența față de probele incubate fără acid L-aspartic ($78{,}10 \pm 18{,}6$ mg/g de țesut) este înalt semnificativă ($p < 0{,}001$,) sugerînd predominența proceselor proteolitice în absența aminoacidului. Scăderea acizilor nucleici tisulari în urma proceselor de depolimerizare și de catabolism este semnificativă ($0{,}05 > p > 0{,}02$) la probele incubate fără aminoacid (fig. 4). De la $10{,}96 \pm 2{,}34$ mg/g de țesut, acizii nucleici



N	10	10	10
$\bar{X}$	85,94	99,68	78,19
δ	±7,29	±11,41	±8,61
t	3,045	4,512	
p	0,01>p>0,001	p<0,001	
t_{13}	2,062		
p_{13}	0,05>p>0,02		

Fig. 3. — Nivelul proteinelor tisulare.

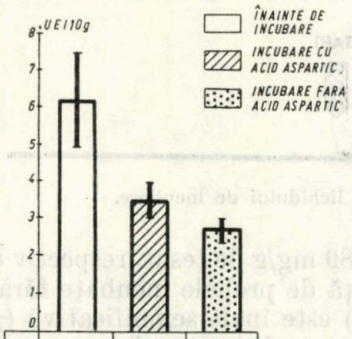


N	7	7	7
$\bar{X}$	10.963	9.815	6.775
δ	±2.342	±2.246	±1.738
t	0,981	2,542	
p	>0,50	0,05>p>0,02	

Fig. 4. — Nivelul acizilor nucleici tisulari.

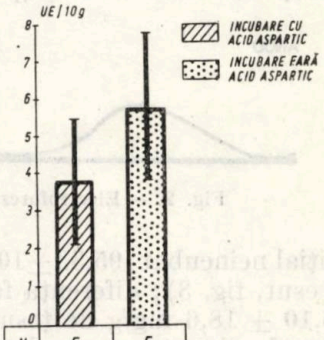
scad ușor în probele incubate cu aspartat ($9{,}81 \pm 2{,}46$ mg/g de țesut) și aproape la jumătate în cele fără adaos de acid L-aspartic ($6{,}77 \pm 1{,}74$ mg/g de țesut). Nucleotidele acidosolubile extrase din țesut înregistrează de

asemenea scăderi semnificative ($p < 0{,}01$), care nu se reflectă la fel de semnificativ ($0{,}25 > p > 0{,}10$) în mediul de incubare (fig. 5 şi 6).



N	5	5	5
X	6.198	3.452	2.680
δ	±1.333	±0.443	0.303
t	3.909		3.844
p	< 0.01		< 0.01

Fig. 5. — Nivelul nucleotidelor libere tisulare.



N	5	5
X	3,78	5,72
δ	±1,712	±2,057
t	1,615	
p	0,25 > p > 0,10	

Fig. 6. — Prezenţa nucleotidelor libere în mediul de incubare. Dimensiunea figurilor se poate reduce în funcţie de necesităţile grafice.

DISCUŢII

Incubarea *in vitro* a feliilor de ficat reprezintă unul dintre cele mai simple şi mai comode modele experimentale [6], [16]. Deşi condiţiile sînt mai puţin fiziologice, neajunsul este compensat de avantajele urmăririi dinamice a unor procese metabolice mai generale. Modelul oferă însă posibilităţi limitate pentru studiul unei singure reacţii metabolice sau a comportamentului unei singure enzime [6].

Feliile de ficat sînt lipsite de o circulaţie capilară funcţională, schimburile dintre ţesut şi mediu făcîndu-se prin difuziune; concentraţia fiecărui substrat din mediu, venind astfel în contact nemijlocit cu felia, va fi în concentraţie mai mare decît cea întîlnită în organismul animalului. În consecinţă, atît viteza de desfăşurare a reacţiilor, cît şi nivelele unor produşi rezultaţi din acestea nu sînt întru totul comparabile cu situaţia *in vivo*, fapt care nu trebuie neglijat la interpretarea rezultatelor.

Observarea directă a sintezei de proteine hepatice în condiţiile de incubare amintite, ca şi aceea a acizilor nucleici, reprezintă un rezultat datorit unor procese în echilibru permanent dinamic, care înclină, în general, în favoarea proceselor de degradare [21]. S-a demonstrat experimental că feliile de ficat încorporează aminoacizi în proteine în mod liniar timp de 2 ore sau mai mult, în funcţie de concentraţia aminoacidică a mediului de incubare [5]. Totuşi, determinările de profil ale polisomilor la intervale diferite ale incubării au arătat o dezagregare treptată, cu

tendința de creștere a fracțiunii de monosomi [26]. Din datele obținute de noi rezultă că proteinele tisulare au un nivel mai crescut în prezența acidului L-aspartic decît în cazul incubării fără aminoacid. S-ar părea că efectul stimulator metabolic al aminoacidului ar putea să întîrzie dezagregarea polisomilor hepatici, menținînd un nivel mai înalt al sintezei proteinice prin această acțiune protectoare.

În concepția actuală, procesele transportului intracelular și ale secreției proteinelor sintetizate pentru export sînt în funcție de integritatea morfofuncțională a sistemelor de membrane (reticul endoplastic, aparatul Golgi, membrana celulară). Transferul prin aceste membrane se face fie datorită unei continuități anatomice, fie printr-un flux transmembranar de la un compartiment la altul [18]. De asemenea s-a subliniat rolul ionilor de potasiu în sinteza de albumină și asupra procesului de transfer în toate etapele, de la ribozomi pînă în afara celulei [11], [16]. Utilizînd mediul de incubare Krebs-Ringer fosfat, s-a asigurat o bună conservare de K^+ intracelular timp de mai multe ore [16].

Acidul L-aspartic este unul dintre precursorii esențiali ai nucleotidelor pirimidinice și un donator de amină la biosinteza purinelor. Încorporarea *in vitro* a acidului L (3-^{14}C)-aspartic în pirimidinele din ARN este inhibată de către adenină și 5′-AMP, fără ca acestea să exercite vreun efect asupra încorporării aminoacidului în proteine [3]. Se pare că încorporarea acidului aspartic în nucleotide este un proces reglat în celulă. În condițiile de incubare utilizate de noi, conținutul în acizi nucleici scade foarte puțin în prezența acidului aspartic față de nivelul inițial, în timp ce în lipsa aminoacidului scăderea este semnificativă. Această ultimă diferență pare să sugereze o mai accentuată întîrziere a degradării acizilor nucleici. Nucleotidele acido-solubile tisulare sînt reduse la aproximativ 50% din nivelul inițial în feliile incubate fără adaos de acid L-aspartic. Aceasta ar pleda fie pentru o pierdere a lor în mediul de incubare, fie pentru o catabolizare mai accentuată sau pentru ambele. Nivelul tisular mai crescut în probele incubate cu aminoacid și mai scăzut în mediul de incubare al acestor probe sugerează un grad crescut de polimerizare în macromolecula nucleică sau, cel puțin, o depolimerizare întîrziată. Sinteza de nucleotide este posibilă în feliile de ficat pe baza substratelor endogene dacă se asigură o oxigenare suficientă. S-a demonstrat dealtfel că prin incubare la 38°C conținutul de ATP al feliilor de ficat poate să crească la valori similare cu cele *in vivo* nu numai din nucleotidele adenilice preexistente, ci și din precursori [24], printre care se numără și acidul aspartic.

CONCLUZII

1. Metoda incubării *in vitro* a feliilor de ficat reprezintă un model experimental utilizabil în aprecierea influenței unor substanțe asupra metabolismului celular.

2. Acidul L-aspartic determină, în condiții de incubare *in vitro*, o creștere semnificativă a sintezei de proteine.

3. Efectul hepatoprotector al acidului aspartic s-ar putea exercita prin întîrzierea degradării acizilor nucleici corelată cu sinteza de proteine endocelulare şi de secreţie.

Prezentat la redacţie la 4 noiembrie 1971

I.M.F. Cluj, Clinica III medicală
Institutul de sănătate publică
şi cercetări medicale, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. Barbarino F., Fodor O., Tăpălagă D., Cotuţiu C., Streja D., St. cerc. med. int., **6**, 525 (1967).
2. Barbarino F., Fodor P., Tăpălagă D., Cotuţiu C., Streja D., Lucr. Congr. gastroenterologie, Bucureşti, 1967, p. 226.
3. Bresnick E., Fed. Proceed., **22**, 533 (1963).
4. Cartier P., Leroux I. P., Rev. Fr. Etud. clin. et biol., **11**, 248 (1966).
5. Clemens M. I., Korner A., Biochem. J., **119**, 629 (1970).
6. Elliot K. A. C., Colowick S. P. şi Kaplan N. O., în *Methods in Enzymology*, vol. I, New York, Academic Press, 1955, p. 3.
7. Fodor O., Abel Ch., Ban A., Rev. Int. Hépatol., **7**, 611 (1957).
8. Fodor O., Cotul S., Barbarino F., Grigoraş D., Nicoară A., Suciu A., St. cerc. med., int., **5**, 405(1968).
9. Fodor O., Szantay I., Cotul S., Rev. roum. med. int., **5**, 387 (1968).
10. Iencica R., Suciu A. (în curs de apariţie).
11. Judan J. D., Nicholls M. C., Biochem J., **116**, 663 (1970).
12. Lebouton A. U., Biochem. J., **106**, 503 (1968).
13. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
14. Madden S. C., Whipple G. H., Physiol. Rew., **20**, 194 (1940).
15. Manchester K. L., Biochem. J., **98**, 711 (1966).
16. McLean A. E. M., Biochem J., **87**, 161 (1963).
17. Miller L. L., Bale W. F., J. exp. Med., **99**, 131 (1954).
18. Oler A., Lombardi B., J. Biol. Chem., **245**, 1282 (1970).
19. Peters T. Jr., J. Biol. Chem., **237**, 1186 (1962).
20. Peters T., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., **182**, 171 (1950).
21. Peters T., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., **186**, 806 (1950).
22. Poznanskaia A. A., Biohimia, **22**, 668 (1957).
23. Schneider W. C., J. Biol. Chem., **161**, 293 (1945).
24. Van Rossum G. D. V., Arch. Biochem. Biophys., **133**, 385 (1969).
25. Wise R. W., Oliver I. T., Biochem J., **102**, 760 (1967).
26. Wittman I. S., Miller O. N., Metabolism, **20**, 141 (1971).

PROTEIN SYNTHESIS AND NUCLEIC ACID LEVEL IN LIVER SLICES UNDER THE PROTECTING INFLUENCE OF L-ASPARTIC ACID

SUMMARY

The influence of L-aspartic acid upon the protein synthesis in liver slices incubated 4 hours in Krebs-Ringer phosphate at 37,5°C is studied. The behaviour of tissue nucleic acids and nucleotides, and the release of proteins and free nucleotides in the incubation medium are studied as well.

The aspartic acid increases significantly the synthesis of the endocellular proteins, and to a smaller extent that of the export proteins. The aspartic acid shows, in these experimental conditions, a protecting effect upon the nucleic acids, probably by hindering their depolymerization.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 311–314 (1972)

MODIFICAREA CONȚINUTULUI ÎN AMINOACIZI LIBERI LA *TENTHREDO ARCUATA* FÖRST. ÎN CURSUL PERIOADEI DE IMAGO

ANA ZAMFIRESCU și ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — S-a efectuat un studiu comparativ asupra conținutului în aminoacizi liberi la insecta *Tenthredo arcuata* Först. în trei faze din cursul perioadei de imago : după apariția insectelor din coconi, depunerea pontei și după depunerea pontei.

S-au constatat unele modificări în compoziția aminoacizilor liberi de la o fază la alta a perioadei de imago și în cadrul aceleiași faze de la un sex la altul.

Studiul aminoacizilor liberi la insecte prezintă o deosebită importanță teoretică și practică, aprecierea caracterelor ecologice ale insectelor și lămurirea unor aspecte referitoare la lanțurile trofice ale faunei deschizînd perspectiva intervenției competente în reglarea relațiilor dintre insecte și plante, insecte și mediu, ca și a unei mai bune aprecieri a poziției lor taxonomice.

Lucrările efectuate pînă în prezent scot în evidență prezența aminoacizilor liberi la insecte în anumite faze de dezvoltare. Astfel Auclair [2] face o comparație între aminoacizii liberi prezenți în hemolimfa afidelor, *Acyrtosiphon pisum* și sucul pe care îl secretă aceste insecte. Drilhon și Busnel [5] au efectuat un studiu asupra aminoacizilor liberi la *Bombyx mori*. Cercetări similare au efectuat Agrill [1], Drilhon [4], Chen și Hadorn [3], Duchateau și Florkin [6] și Wyatt [9]. Nu s-a efectuat însă un studiu comparativ pentru a se urmări modificarea conținutului în aminoacizi liberi la himenopterul *Tenthredo arcuata* Först. în cursul perioadei de imago. De aceea în lucrarea de față se prezintă rezulatele unor cercetări referitoare la aceste modificări.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările s-au efectuat la specia *Tenthredo arcuata* Först. în cursul ciclului de viață al insectei adulte (20 de zile, 6.VII–26.VII 1971).

Probele de insecte s-au colectat în următoarele faze : *faza 1*, imediat după apariția insectelor din coconi, prima fază a adultului. Această fază corespunde cu momentul de împerechere a celor două sexe. S-a colectat un număr egal de masculi și de femele ; *faza 2*, momentul depunerii pontei ; de asemenea s-au colectat masculi și femele în proporție egală ; *faza 3*, după depunerea pontei. În această fază, conținutul în aminoacizi liberi s-a determinat separat pe sexe și pe un amestec de masculi și femele.

Extracţia aminoacizilor liberi s-a făcut din 1 g de insecte (30 de exemplare), care s-au majorat cu apă distilată imediat după recoltare. Proteinele s-au precipitat cu acetonă clorhidrică 1% [7]. Precipitatul format s-a îndepărtat prin centrifugare la 2 000—3 000 rot/min. Supernatantul apos s-a spălat de 3—4 ori cu eter etilic. Stratul apos s-a evaporat la sec, iar reziduul s-a reluat cu o soluţie de amoniac 0,5 N, care s-a aplicat sub formă de spoturi pe hîrtia cromatografică MN 261. Ca solvent pentru migrare s-a folosit un amestec de *n*-butanol-acid acetic-apă 4 : 1 : 1 [8]. Migrarea s-a făcut ascendent timp de 48 de ore. Cromatogramele s-au pulverizat cu ninhidrină 0,2% în butanol.

S-au făcut aprecieri calitative.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Tabela 1 cuprinde modificările produse în conţinutul aminoacizilor liberi la insectele *Tenthredo arcuata* Först. în cursul perioadei de imago.

Rezultatele obţinute arată că între fazele 1 şi 2, respectiv imediat după apariţia insectelor de coconi şi în momentul depunerii pontei, nu se constată diferenţe semnificative la nivelul aminoacizilor liberi. Ambele faze se caracterizează printr-un număr mare de aminoacizi, a căror intensitate este crescută. Prolina nu s-a identificat în aceste faze.

Faza 3, corespunzătoare momentului de după depunerea pontei, se caracterizează prin modificări în conţinutul aminoacizilor liberi. Determinările efectuate la probele care conţin ambele sexe au arătat că modificările sînt de ordin calitativ. În general se constată că intensitatea tuturor aminoacizilor identificaţi e mai mică în comparaţie cu primele două faze. De asemenea semnificative sînt diferenţele dintre sexe, şi anume dintre femele şi masculi. În timp ce la femele numărul aminoacizilor şi intensitatea acestora sînt mari, la masculi acestea sînt reduse. La femele lipseşte, pe lîngă prolină, şi leucina, iar la masculi s-au identificat numai nouă aminoacizi; lipsesc cistina, cisteina, tirozina, metionina, valina, fenilalanina şi leucina.

Cercetările efectuate de noi au arătat că la specia *Tenthredo arcuata* Först. apar modificări semnificative în conţinutul următorilor aminoacizi liberi: cistină, cisteină, prolină, tirozină, metionină, valină, fenilalanină şi leucină. Sinteza aminoacizilor scade din momentul apariţiei insectelor din coconi şi pînă în momentul de după depunerea pontei. În aceeaşi fază de dezvoltare a insectei, în momentul de după depunerea pontei apar unele diferenţieri între sexe: în timp ce femelele se caracterizează printr-o sinteză intensă a aminoacizilor liberi, la masculi aceasta e foarte redusă.

Tabela 1

Modificarea conținutului în aminoacizi liberi la *Tenthredo arcuata* Först. în cursul perioadei de imago

Aminoacizi	♀♂ 1	♀♂ 2	3 ♀a	3 b ♂♀	3 c ♂
Cistină	+	+	+	+	−
Cisteină	+	+	+	+	−
Lizină	+	+	+	+	+
Histidină	+	+	+	+	+
Arginină	+	+	+	+	+
Acid aspartic	+	+	+	+	+
Serină	+	+	+	+	+
Glicocol	+	+	+	+	+
Ac. glutamic	+	+	+	+	+
Treonină	+	+	+	+	+
Alanină	+	+	+	+	+
Prolină	−	−	−	−	−
Tirozină	+	+	+	+	−
Metionină	+	+	+	+	−
Valină	+	+	+	+	−
Fenilalanină	+	+	+	+	−
Leucină	+	+	−	−	−
Total	16	16	15	15	9

\+ aminoacidul prezent
− ,, absent

CONCLUZII

Himenopterul *Tenthredo arcuata* Först. prezintă unele modificări în conținutul aminoacizilor liberi în cursul perioadei de imago. Sfîrșitul acestei perioade, după depunerea pontei, se caracterizează prin reducerea numărului de aminoacizi liberi și prin apariția unor diferențe semnificative între sexe.

Prezentat la redacție la 10 aprilie 1972

Institutul de biologie ,,Tr. Săvulescu''
Secția de ecosisteme terestre

BIBLIOGRAFIE

1. AGRILL I., Acta Phys. Scand., **18**, 247 (1949).
2. AUCLAIR J. L., J. ins. Physiol., **2**, 330 (1958).
3. CHEN P. S., E. HADORN, Rev. Suisse Zool., **61**, 437 (1954).
4. DRILHON A., C.R. Soc. Biol., **144**, 224 (1950).
5. DRILHON A., R. G. BUSNEL, Rev. Ver. a Soie, **1**, 51 (1949).
6. DUCHATEAU G., M. FLORKIN, Arch. Int. Physiol et Biochem., **66**, 573 (1954).
7. HAÏS I. M., K. MACEK, *Cromatografia pe hîrtie*, Bucureşti, Edit. tehnică, 1960, p. 409.
8. TĂNASE I., *Tehnica cromatografică*, Bucureşti, Edit. tehnică, 1967, p. 10.
9. WYATT G. R., Ann. Rev. Ent., **6** (1961).

MODIFICATION OF THE CONTENT IN FREE AMINO ACIDS IN *TENTHREDO ARCUATA* FÖRST. DURING THE IMAGO FERIOD

SUMMARY

A comparative study is made on free amino acids content in *Tenthredo arcuata* Först. in 3 stages during the imago period: after appearance of insects from cocoons, egg laying and after egg laying.

Some modifications in free amino acids content are found, from a stage to another of the imago period and in the same phase from a sex to another.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 315–324 (1972)

UNELE ASPECTE ALE METABOLISMULUI CAROTINOIDELOR ÎN PLANTE (REFERAT GENERAL)

V. TĂMAȘ

Rezumat. — Se abordează aspecte legate de metabolizarea carotinoidelor în plante în lumina celor mai noi date. Se scot în evidență căile posibile de metabolizare ale carotinoidelor. Se conchide că unele carotinoide epoxidice sînt metabolizate pînă la compuși cu un schelet constituit din C_{15}, C_{13} și C_{11}, dintre care unii sînt de o deosebită importanță pentru viața plantelor.

1. INTRODUCERE

Numeroase lucrări efectuate în ultimii ani asupra carotinoidelor au scos la iveală rolul însemnat al acestor pigmenți în dezvoltarea normală a plantelor. Astăzi este recunoscut în unanimitate faptul că pigmenții carotinoidici intervin într-o serie de procese biochimice de cea mai mare importanță pentru viața plantelor. Astfel, carotinoidele participă la procesul de fotosinteză [1]—[4], de fototropism [5], la reacțiile de oxido-reducere [6] și la alte procese din viața plantei.

Carotionidele sînt pigmenți universal răspîndiți în organisme și se află în țesuturile vii sub formă de carotinoproteide. Dar, deși cele mai multe carotinoproteide au fost izolate din organisme animale, ele se află și în plante [7]. Astăzi se consideră că compușii carotinoproteidici reprezintă starea naturală a tuturor carotinoidelor și că ei joacă un rol primordial în biochimia carotinoidelor, îndeosebi în procesul de metabolizare, întrucît sub această formă carotinoidele sînt deosebit de reactive.

În cele ce urmează se vor aborda cele mai noi aspecte ale transformărilor oxidative *in vivo* ale carotinoidelor, avîndu-se în vedere în primul rînd transformările cu formare de produși de degradare, din care motiv sînt cuprinse sub denumirea de metabolizare.

2. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA METABOLIZĂRII CAROTINOIDELOR

Existența în natură a carotinoidelor aldehidice (apo-carotinali) și obținerea lor prin sinteză au făcut posibil într-o oarecare măsură interpretarea modului lor de formare, respectiv a modalității de metabolizare a carotinoidelor superioare, îndeosebi a celor din seria C_{40}. În acest sens s-au emis diferite ipoteze. Astfel se consideră că scindarea scheletului carotinoidic în țesuturile fotosintetizante decurge pe cale enzimatică sub

acţiunea lipoxidazelor, iar în cele nefotosintetizante printr-o oxidare directă cu oxigen molecular [8]. Pentru a fi metabolizate, carotinoidele trebuie să fie mai întîi activate. Activarea lor este determinată în mare măsură de existenţa complexului carotinoproteidic şi este realizată pe cale fotochimică. Sub acţiunea luminii sau a ionilor H^+ se formează izomeri *cis-trans*, care sînt forme deosebit de reactive în comparaţie cu formele *trans* totale [9], [10]. Aşa se explică rapida degradare a carotinoidelor în prezenţa luminii şi stabilitatea relativ mare a celor păstrate la întuneric, respectiv a celor aflate în condiţii cu pH acid în comparaţie cu cele aflate în condiţii de pH cu valori aproape de punctul de neutralitate. În prezent se ştie că distrugerea carotinoidelor în cloroplastele intacte este în funcţie de starea în care ele se găsesc, şi anume după cum sînt în forme oxigenate sau neoxigenate. Astfel, carotinoidele epoxidice sînt mult mai repede degradate decît formele neepoxidate [11]. Se pare că prima treaptă în metabolizarea carotinoidelor o constituie derivaţii epoxidici, îndeosebi 5,6-epoxizii. În prezent se cunosc epoxi-carotinoide care conţin gruparea epoxidică atît la ciclul β-ononic [12] şi pseudoononic [13], cît şi în catena laterală [14] (fig. 1).

Derivaţii epoxidici sînt compuşi foarte labili, putînd suferi diferite transformări şi da naştere la carotinoide hidroxilice, aldehidice, cetonice şi carboxilice. Acest fapt denotă că epoxicarotinoidele constituie faza

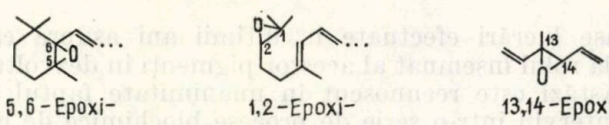


Fig. 1. — Principalele tipuri de epoxizi-carotinoidici.

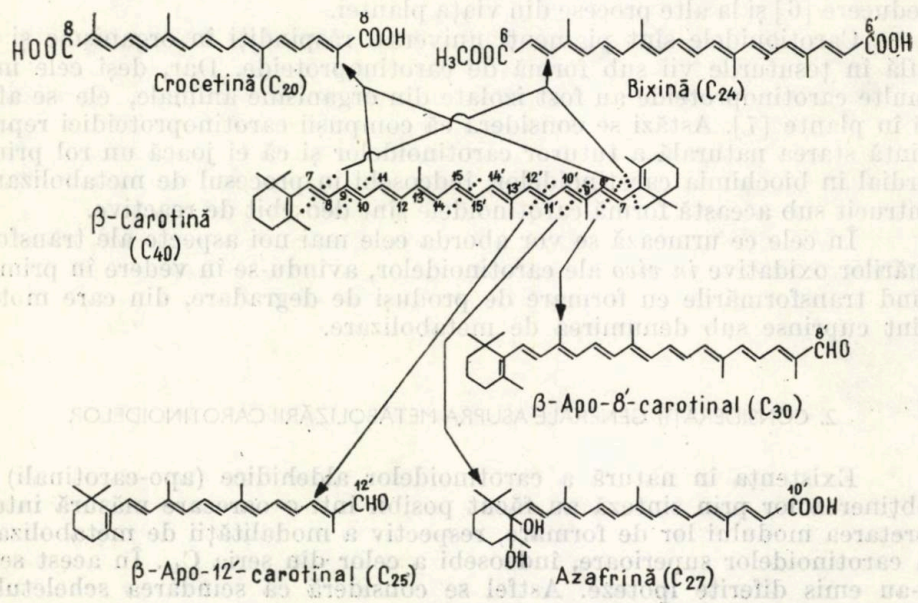


Fig. 2. — Principalele carotinoide naturale rezultate prin metabolizarea β-carotinei.

primară în transformarea oxidativă a tuturor carotinoidelor, iar punctele de atac sînt dublele legături C=C, atît cele din ciclul β-iononic, cît și cele din catena liniară [15].

Întrucît cercetările întreprinse în vederea elucidării metabolizării carotinoidelor s-au efectuat mai cu seamă asupra β-carotinei atît *in vivo* cît și *in vitro*, majoritatea datelor experimentale se referă la modalitățile de transformare ale acesteia. În diferite plante au fost puși în evidență compuși rezultați prin oxidarea β-carotinei (fig. 2).

Transformări analoge suferă și carotinoidele hidroxilice și cetonice de tipul β-carotinei, precum și cele de tipul α-, γ-carotinei și licopinei, fapt confirmat prin degradări enzimatice ale diferitelor carotinoide, efectuate cu sisteme de lipoxidaze izolate din bobul de soia [16].

3. CĂILE DE METABOLIZARE A CAROTINOIDELOR ÎN PLANTE ȘI PRINCIPALII LOR METABOLIȚI

Pe baza datelor experimentale existente în literatura de specialitate asupra transformărilor carotinoidelor în organismele vii, în plante și animale, se poate conchide că metabolizarea lor parcurge atît căi comune, cît și căi diferite. Astfel metabolizarea β-carotinei în plante și animale decurge prin ruperea catenei în diferite puncte, după cum rezultă din modelul redat în figura 3.

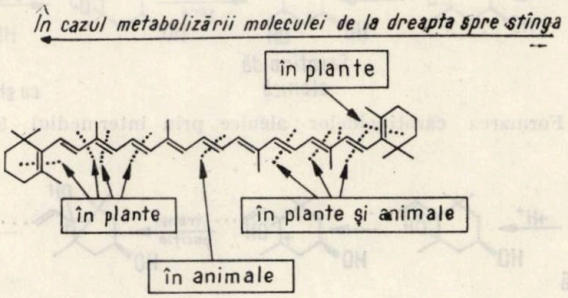


Fig. 3. — Puncte de atac la metabolizarea β-carotinei în plante și animale (în cazul cînd oxidarea decurge de la capătul din partea dreaptă a moleculei).

Din figura 3 rezultă că în plante se pot distinge două moduri diferite de metabolizare, care constau din transformări oxidative la nivelul ciclului β-iononic, cu formare de carotinoide aciclice, dar cu același număr de atomi de carbon, și din transformări în catena liniară, cu formare de carotinoide cu mai puțin de 40 de atomi de carbon în moleculă și chiar de compuși cu catenă mai scurtă.

a) Transformări la nivelul ciclului β-iononic

Carotinoidele din seria C_{40}, care conțin în moleculă ciclul β-iononic, pot fi transformate oxidativ în derivați oxigenați. Aceste transformări sînt rearanjări ale sistemului polienic și au loc prin intermediul 5,6-epoxi-

derivaților. Astfel eșșolțxantina, carotinoidă prezentă în petalele plantei *Eschscholtzia californica*, se formează din zeaxantină prin intermediul anteraxantinei (5,6-epoxidul zeaxantinei), după mecanismul redat în figura 4 [17].

Carotinoidele cu structură β-iononică constituie, de asemenea, precursori biogenetici ai carotinoidelor alenice. Aceste carotinoide se pot forma din epoxizi atît ai carotinoidelor cu structură β-iononică, cît și ai celor acetilenice, după mecanismul redat în figura 5 [18].

Pentru multe ceto-carotinoide cu structură pentaciclică, cum sînt capsantina, capsantona, capsorubina și capsorubona, răspîndite mai cu seamă în ardei, precursorul biogenetic îl constituie anteraxantina [19], [20], după cum rezultă din figura 6.

Recent au fost izolate din fructe citrice (îndeosebi din fructe coapte) o serie de ceto-carotinoide aciclice, cum sînt semi-β-carotinona, β-carotinona [21], semi-α-carotinona și trifasiaxantina [22] (fig. 7). Astfel

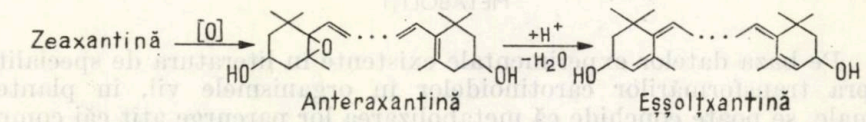


Fig. 4. — Transformarea *in vivo* a zeaxantinei în eșșolțxantină.

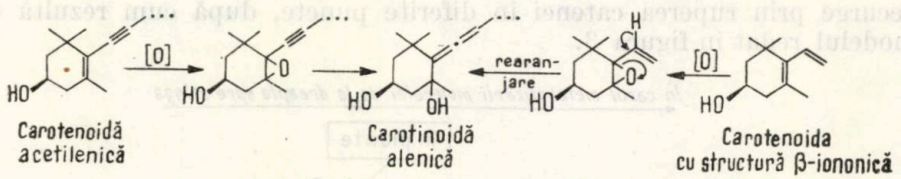


Fig. 5. — Formarea carotinoidelor alenice prin intermediul 5,6-epoxizilor.

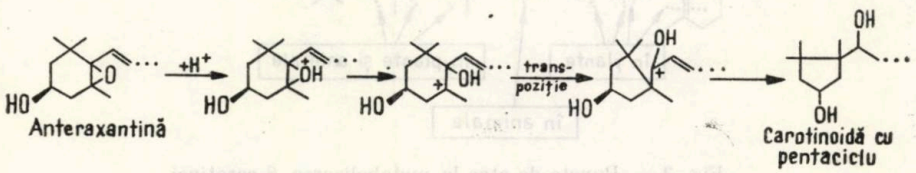


Fig. 6. — Formarea carotinoidelor pentaciclice din carotinoide 5,6-epoxidice.

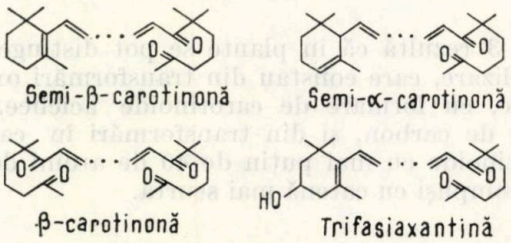


Fig. 7. — Ceto-carotinoide aciclice naturale.

de ceto-carotinoide se formează din carotinoide care conțin ciclul β-iononic în urma unui proces de oxidare, cu deschiderea acestui ciclu după mecanismul redat în figura 8.

Precursorii biogenetici ai acestor ceto-carotinoide sînt: β-carotina →semi-β-carotinona→β-carotinona; α-carotina→semi-α-carotinona; criptoxantina→trifasiaxantina [22]. Demn de semnalat este faptul că criptoxantina este degradată numai la ciclul β-iononic nesubstituit.

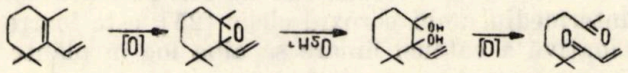


Fig. 8.—Mecanismul de formare a ceto-carotinoidelor aciclice.

b) Transformări la nivelul catenei liniare (oxidare terminală)

Izolarea din produse vegetale, îndeosebi din citrice, a unei serii de carotinoide formate din mai puțin de 40 de atomi de carbon în moleculă și avînd grupări aldehidice, cum sînt β-apo-carotinalii (β-apo-2′-carotinalul, β-apo-6′6carotinalul, β-apo-8′-carotinalul, β-apo-10′-carotinalul și β-apo-12′-carotinalul), β-apo-carotinalii (α-apo-8′-carotinalul și α-apo-10′-carotinalul) și apo-licopinalii (apo-6′-licopinalul și apo-6′-licopenoatul de metil), a dus la emiterea ipotezei că metabolizarea carotinoidelor aciclice și a catenei liniare din cele ciclice decurge printr-un proces de β-oxidare [23]. Dar, în ceea ce privește mecanismul intim de metabolizare în plante, sînt încă prea puține dovezi experimentale. Date interesante asupra metabolizării carotinoidelor prin β-oxidare s-au obținut la organismele animale [24] și se consideră că procesul este analog și la plante. Metabolizarea β-carotinei prin procesul β-oxidării și produșii rezultați sînt redați în figura 9.

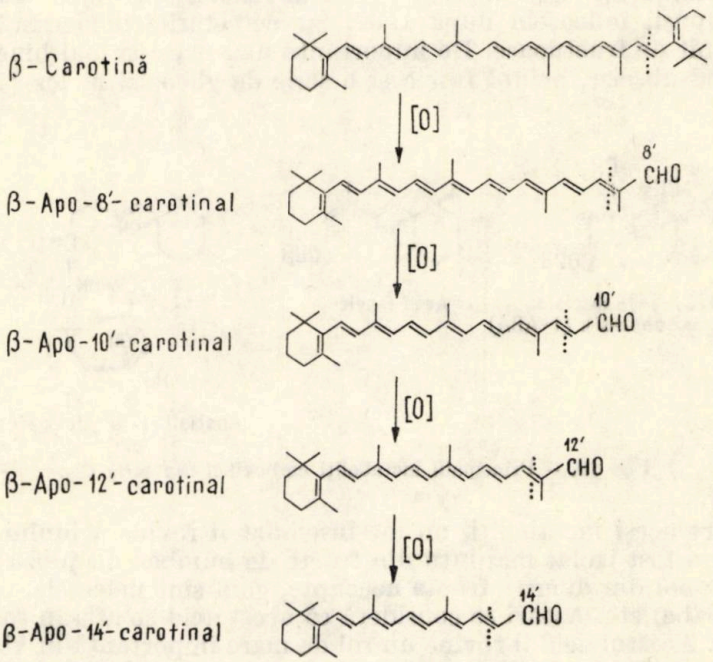
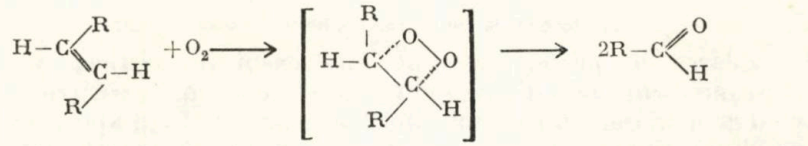


Fig. 9.—Transformarea β-carotinei în β-apo-carotinali prin β-oxidare (oxidare terminală).

Deși au fost identificate carotinoide aldehidice cu peste 23 de atomi de carbon în moleculă, în plante nu au fost semnalate pînă în prezent vitamine A, care se formează numai în organismele animale. Întrucît în organismele animale unele carotinoide (provitaminele A) sînt metabolizate în vitamine A, iar mecanismul de formare a acestor vitamine decurge prin intermediul unui peroxid ciclic [25], este foarte probabil ca degradarea oxidativă a catenei liniare să aibă loc în plante prin același mecanism :

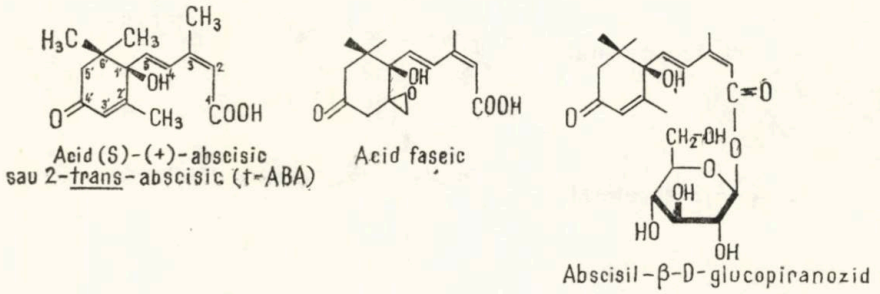


β—Carotină — Intermediar peroxidic ciclic — Retinal (în animale) Carotinali (în plante)

În timpul din urmă au fost identificați în diferite plante o serie de compuși puternic oxigenați și cu catenă scurtă, unii dintre ei avînd 15, iar alții doar 13 sau 11 atomi de carbon în moleculă. Acești compuși reprezintă principalii metaboliți ai carotinoidelor în plante, iar unii dintre ei sînt de o deosebită importanță pentru viața plantelor.

Dăm în continuare principalii metaboliți ai carotinoidelor identificați în plante.

Metaboliți C_{15}. Din această grupă de metaboliți s-au izolat mai mulți compuși, îndeosebi după 1967, iar cercetările în această direcție sînt deosebit de fructuoase. De importanță mai mare și mai bine studiați sînt : acidul abscisc, acidul faseic și o serie de glicozizi ai lor [26]—[28] (fig. 10).



Acid (S)-(+)-abscisic sau 2-trans-abscisic (t-ABA) — Acid faseic — Abscisil-β-D-glucopiranozid

Fig. 10. — Principalii metaboliți carboxilici din seria C_{15}.

Dintre acești metaboliți, un loc însemnat îi revine acidului abscisic. Acest acid a fost izolat mai întîi din fructe de bumbac neajunse la maturitate, iar apoi din diferite fructe necoapte, cum sînt măcești, căpșunile, fasolea (boabe) etc. Astăzi se consideră că acest acid se află în toate plantele tinere. Acestui acid îi revine un rol de mare importanță în viața plantelor, întrucît el manifestă o acțiune fitohormonală, îndeplinind o funcție de reglare a unui mare număr de procese biochimice [28]—[30]. El este

un excelent inhibitor de creştere, îndeosebi al germinaţiei seminţelor, unde intervine ca blocant al sintezei *s*-ARN-ului şi a activităţii amilazelor, dar manifestă şi un rol de dezvoltare a unor ţesuturi ale plantei, intervenind mai cu seamă în grăbirea procesului de înflorire [31]. Acidul faseic, care este derivatul epoxidic al acidului abscisic, manifestă o activitate fitohormonală mult mai redusă în comparaţie cu aceea a acidului abscisic. Pe de altă parte, acidul abscisic de formă *cis* este lipsit de activitate fitohormonală.

Recent s-au identificat o serie de aldehide cu C_{15}, cunoscute sub denumirea de „xantoxine" [27], care este un amestec de aldehide C_{15}, mai importante fiind I şi II [32] (fig. 11).

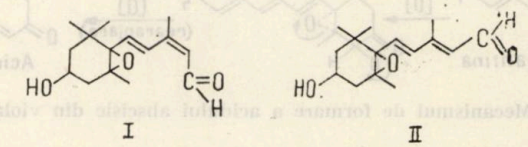


Fig. 11. — Principalii metaboliţi aldehidici din seria C_{15} cu rol de precursori biogenetici ai formelor carboxilice.

Cu privire la formarea metaboliţilor C_{15} s-au emis două ipoteze: una că ei s-ar forma prin degradarea oxidativă a carotinoidelor din seria C_{40} [22], [27], [32] şi alta că ei ar rezulta pe cale biosintetică a carotinoidelor din acid mevalonic [26].

În formarea metaboliţilor C_{15} prin metabolizarea carotinoidelor din seria C_{40} este confirmat faptul că precursorii biogenetici sînt unele carotinoide epoxidice, ca, de exemplu, violaxantina şi neoxantina [27], dar şi unele carotinoide de formă *retri*, cum este eşşolţxantina [32] (fig. 12).

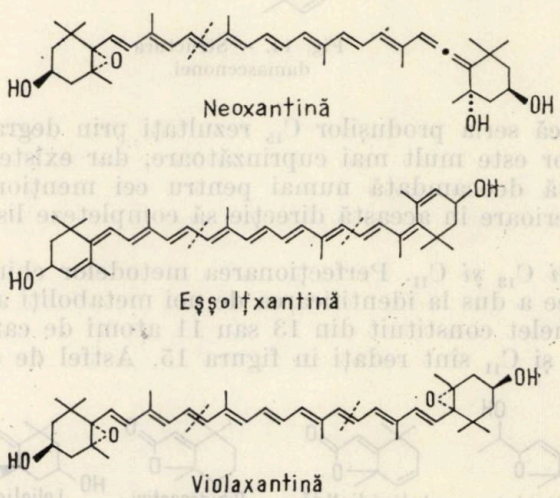


Fig. 12. — Carotinoide cu rol de precursori biogenetici ai metaboliţilor C_{15}.

Atît violaxantina, cît și neoxantina sînt xantofile epoxidice larg răspîndite în țesuturile vegetale, îndeosebi în frunze, unde se găsesc în toate perioadele de vegetație. Degradarea acestor carotinoide este facilitată de lumină, îndeosebi de razele ultraviolete, ceea ce denotă că la baza acestui proces stă fotoliza [27]. Acest punct de vedere a fost confirmat experimental prin iradierea violaxantinei [27], [31] și neoxantinei [27], putîndu-se izola metaboliți C_{15}. Totodată, asemănarea structurală a metaboliților C_{15} cu xantofilele menționate constituie un indiciu în plus că aceste carotinoide îndeplinesc rolul de precursori ai acestor metaboliți. Transformarea violaxantinei în acid abscisic este redată în figura 13 [34].

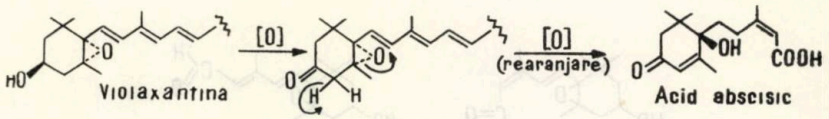


Fig. 13. — Mecanismul de formare a acidului abscisic din violaxantină.

Pe de altă parte, existența acidului abscisic în țesuturile plantelor tinere și în plantele mature denotă că el nu este un produs exclusiv de metabolizare a carotinoidelor. Acest fapt este confirmat de prezența acidului abscisic în fructele de căpșuni înaintea existenței pigmenților carotinoidici [35] și de creșterea conținutului lui odată cu descreșterea conținutului în gibereline și viceversa [36].

Se cunosc și metaboliți C_{15} fără funcții biochimice. Astfel, demascenona, izolată din esența de trandafir bulgăresc (*Rosa damascenona* Mill.), reprezintă componenta principală a acestei esențe [37] (fig. 14).

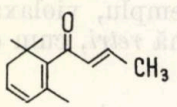


Fig. 14. — Structura damascenonei.

Desigur că seria produșilor C_{15} rezultați prin degradarea *in vitro* a carotinoidelor este mult mai cuprinzătoare, dar existența în plante a fost confirmată deocamdată numai pentru cei menționați, urmînd ca cercetările ulterioare în această direcție să completeze lista cu noi reprezentanți.

Metaboliți C_{13} *și* C_{11}. Perfecționarea metodelor chimice, biochimice și fizico-chimice a dus la identificarea de noi metaboliți ai carotinoidelor, care au un schelet constituit din 13 sau 11 atomi de carbon. Principalii metaboliți C_{13} și C_{11} sînt redați în figura 15. Astfel de compuși au fost

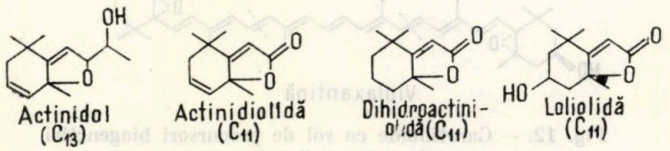


Fig. 15. — Principalii metaboliți din seria C_{13} și C_{11} găsiți în plante.

izolați din diferite specii de plante din Asia și din Africa [38]—[40] și din unele arome de ceai [40].

Un model biosintetic al acestor compuși a fost realizat pe β-iononă [41] și apoi pe β-carotină [42] prin fotooxidare exhaustivă, după mecanismul redat în figura 16. Această transformare confirmă faptul că precursorii biogenetici ai carotinoidelor cu schelet C_{13} și C_{11} sînt carotinoidele, iar formarea lor în plante parcurge un mecanism analog fotooxidării arătate în figura 16.

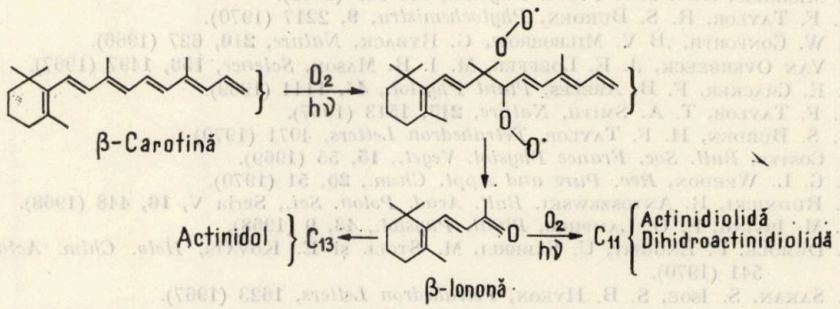


Fig. 16. — Model biosintetic pentru formarea metaboliților C_{13} și C_{11}.

În concluzie, cercetările cu privire la metabolizarea carotinoidelor în plante, deși încă în fază de pionierat, deschid perspective asupra cunoașterii modalităților de transformare a carotinoidelor și asupra mecanismului de formare al unor substanțe de natură fitohormonală, esențiale pentru viața plantelor.

Prezentat la redacție la 22 aprilie 1971

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj
Catedra de chimie

BIBLIOGRAFIE

1. V. H. Lynch, C. S. French, *Arch. Biochem. Biophis.*, **70**, 382 (1957).
2. I. H. Smith, C. S. French, *Ann. Rev. Plant Phisiol.*, **14**, 181 (1963).
3. T. W. Goodwin, în *Biochemistry of Chloroplasts*, vol. I, Londra—New York, Academic Press, 1966, p. 423.
4. E. H. Horvatovic, *Nature*, **209**, 1135 (1966).
5. K. V. Thimann, G. M. Curry, în *Comparative Biochemistry*, ed. M. Florkin, H. S. Mason, vol. I, Londra—New York, Academic Press, 1960, p. 423.
6. N. I. Krinsky, *Photophysiol.*, 123 (1968).
7. M. Nishimura, K. Takamatsu, *Nature*, **180**, 699 (1957).
8. F. W. Quackenbush, *Cereal Chem.*, **40**, 266 (1963).
9. V. L. Singleton, W. A. Gortner, H. Y. Young, J. Food. Sci., **26**, 49 (1961).
10. W. A. Gortner, V. L. Singleton, *J. Food Sci.*, **26**, 53 (1961).
11. J. S. Friend, A. M. Mayer, *Biochem., Biophys. Acta*, **41**, 422 (1960).
12. P. Karrer, E. Jucker, *Helv. Chim. Acta*, **39**, 229 (1946).
13. G. Britton, T. W. Goodwin, *Phitochemestry*, **8**, 2257 (1969).
14. E. Nicoară, D. Oșianu, C. Bodea, *Rev. Roumaine Chim.*, **15**, 965 (1970).
15. C. O. Chichester, T. O. M. Nakayama, în *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, ed. T. W. Goodwin, Londra—New York, Academic Press, 1965, p. 446.

16. A. WINTERSTEIN, A. STUDER, R. RÜEGG, *Chem. Ber.*, **93**, 2951 (1960).
17. R. J. H. WILLIAMS, G. BRITTON, T. W. GOODWIN, *Biochim. Biophis. Acta*, **124**, 200 (1966).
18. S. W. RUSSEL, B. C. L. WEEDON, *Chem. Comm.*, 85 (1969).
19. R. ENTSCHEL, P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 89 (1960).
20. B. H. DAVIES, S. MATTHEWS, J. T. O. KIRK, *Phytochemistry*, **9**, 797 (1970).
21. H. YOKOYAMA, M. J. WHITE, *Phytochemistry*, **7**, 1031 (1968).
22. H. YOKOYAMA, M. J. WHITE, *Phytochemistry*, **9**, 1795 (1970).
23. H. GLOVER, E. R. REDFEARN, *Biochem. J.*, **58**, XV (1954).
24. I. WILDFEUER, *Z. Lebensm.-Untersuch.*, **140**, 140 (1969).
25. D. S. GOODMAN, H. S. HUANG, T. SHIRATORI, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1929 (1966).
26. L. MICHALIS, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **20**, 139 (1969).
27. H. F. TAYLOR, R. S. BURDEN, *Phytochemistru*, **9**, 2217 (1970).
28. J. W. CONFORTH, .B V. MILBORROW, G. RYBACK, *Nature*, **210**, 627 (1966).
29. J. VAN OVERBEECK, J. E. LOEFFER, M. I. R. MASON, *Science*, **156**, 1497 (1967).
30. L. E. CRACKER, F. B. ABELES, *Plant Physiol.*, **44**, 1144 (1969).
31. H. F. TAYLOR, T. A. SMITH, *Nature*, **215**, 1513 (1967).
32. R. S. BURDEN, H. F. TAYLOR, *Tetrahedron Letters*, 4071 (1970).
33. C. COSTES, *Bull. Soc. France Physiol. Veget.*, **15**, 55 (1969).
34. B. C. L. WEEDON, *Rev. Pure and Appl. Chem.*, **20**, 51 (1970).
35. R. RUDNICKI, R. ANTOSZEWSKI, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, Seria V, **16**, 448 (1968).
36. R. M. IRVING, F. O. LAMPHER, *Plant. Physiol.*, **43**, 9 (1968).
37. E. DEMOLE, P. ENGGIST, U. SÄBERLI, M. STOLL şi E. KOVATS, *Helv. Chim. Acta*, **53**, 541 (1970).
38. T. SAKAN, S. ISOE, S. B. HYEON, *Tetrahedron Letters*, 1623 (1967).
39. J. BRICOUT, R. VIANI, F. MÜGGLER-CHAVAN, J. P. MARION, D. RAYMOND, R. H. EGLI, *Helv. Chim. Acta*, **50**, 1517 (1967).
40. E. DEMOLE, F. ENGGIST, *Helv. Chim. Acta*, **51**, 481 (1968).
41. S. ISOE, S. B. HYEON, H. ICHIKAWA, S. KARSUMURA, T. SAKAN, *Tetrahedron Letters*, 5561 (1968).

SOME ASPECTS OF CAROTENOID METABOLISM IN PLANTS (GENERAL REFERAT)

SUMMARY

The process of carotenoid metabolism in plants is shown in the light of the latest data recorded. The pathways of carotenoid metabolism in plants are outlined. It is concluded that some epoxy-carotenoids are metabolized into compounds constituted of a C_{15}, C_{13} and C_{11} frame, some of them presenting a particular importance for the life of plant.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 3, 325–336 (1972)

J. MÜLLER, *Regulation of aldosterone biosynthesis* (Reglarea biosintezei aldosteronei), Berlin–Heidelberg–New York, Springer-Verlag, 1971, 137 p.

Problema controlului fiziologic al secreţiei de aldosteronă a constituit obiectul a numeroase cercetări între 1950 şi 1960. Concluziile, de un deosebit interes, ale acestor studii amănunţite au arătat că secreţia de aldosteronă este cu prioritate reglată de sistemul renină-angiotensină, nivelul sodiului şi al potasiului plasmatic şi secreţia de ACTH jucînd în această reglare un important rol secundar.

Lucrarea de faţă aruncă o nouă lumină asupra sistemului de control complex în ceea ce priveşte producerea aldosteronei în organismul mamiferelor. Autorul redă o serie de experienţe personale prin care se urmăreşte un studiu mai amănunţit al interacţiunilor dintre adrenocortex şi substanţele capabile să influenţeze direct biosinteza aldosteronei.

Lucrarea cuprinde o introducere şi şase capitole, dintre care ultimul dă concluziile întregului material.

În primul capitol se menţionează adrenocortexul ca singura sursă de producere a aldosteronei la om şi la diferite specii de mamifere.

Capitolul II descrie calea de biosinteză a aldosteronei, cu punct de plecare colesterolul. Transformările suferite pînă la faza finală cuprind cinci produşi intermediari: pregnenololul, progesteronul, 11-dezoxicorticosteronul, corticosteronul şi 18-hidroxicorticosteronul.

Capitolul III descrie participarea fracţiunilor subcelulare la biosinteza aldosteronei în sisteme acelulare de omogenate.

În capitolul IV se descriu factorii care influenţează direct biosinteza aldosteronei, în speţă experimentele de incubaţie sau de perfuzie cu angiotensină, influenţa cationilor mono- şi bivalenţi, a ACTH-ului, AMP-ului, serotoninei etc.

În sfîrşit, capitolul V tratează cauzele şi condiţiile alterării biosintezei şi secreţiei de aldosteronă.

În concluziile cuprinse de ultimul capitol al lucrării se arată multitudinea substanţelor cu acţiune stimulantă asupra aldosteronei, zonele de acţiune a acestor substanţe, dependenţa lor de sinteza proteică, manifestarea lor, probabil, pe ultima treaptă a biosintezei aldosteronei şi, în fine, caracteristicile diferenţiale pentru diferite specii de animale manifestate în biosinteza şi secreţia aldosteronei.

Lucrarea conţine de asemenea un bogat material iconografic şi un impresionant material bibliografic de specialitate. Ea se recomandă medicilor şi biochimiştilor.

Mioara Cârsteanu
Institutul de biochimie
Bucureşti

HANS-JÜRGEN REHM, *Einführung in die industrielle Mikrobiologie* (Introducere în microbiologia industrială), Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 241 p.

Lucrarea pe care o prezentăm face parte din colecţia „Heidelberger Taschenbücher" (seria medicină-biologie), publicată de Editura „Springer", şi constituie un mijloc rapid de introducere şi de informare în multiplele şi variatele aspecte ale microbiologiei industriale. Concepută ca o introducere în acest domeniu important al activităţii practice, lucrarea cuprinde, pe lîngă elementele de bază — microorganismele şi produşii biologici obţinuţi din acestea —, aspectele tehnice ale producerii la scară industrială a microorganismelor, precum şi aplicaţiile lor în diferitele sectoare economice.

Materialul este sistematizat în cinci capitole principale.

Primul capitol se referă la microorganismele importante pentru industrie ; autorul are în vedere în acest sens bacteriile, drojdiile, ciupercile şi algele, creşterea şi dezvoltarea acestora pe diferite medii de cultură (în special pe cele utilizate în industrie) şi în funcţie de diferiţi parametri ; se opreşte apoi asupra unor principale căi metabolice din celulele microorganismelor, precum şi asupra metodelor de izolare, selecţionare, obţinere de mutanţi şi de păstrare a culturilor de importanţă industrială.

Al doilea capitol cuprinde principiile de bază ale fermentaţiilor ; sînt descrise diferitele procedee şi instalaţii folosite în industrie pentru cultivarea microorganismelor, sterilizarea instalaţiilor şi mediilor de cultură, aerarea şi agitarea culturilor, precum şi procedeele de prevenire a spumării lor.

În capitolul al treilea sînt prezentaţi diferiţii produşi obţinuţi cu ajutorul microorganismelor sau din prelucrarea culturilor acestora, ca de exemplu solvenţi organici, acizi organici, aminoacizi, oligo- şi polizaharide, antibiotice, vitamine, gibereline, alcaloizi, produşi de metabolizare a acizilor nucleici şi proteinelor, inclusiv enzime, reacţiile de transformare realizate în prezenţa unor microorganisme, producerea de masă celulară pentru diferite utilizări, etc.

Capitolul al patrulea se referă la alte procese microbiologice şi la perspectivele de aplicare în practică a unora dintre acestea. Autorul se opreşte în acest sens la microbiologia călătoriilor în spaţiul cosmic, producerea de energie electrică cu ajutorul microorganismelor ş.a.

Ultimul capitol, scurt faţă de celelalte, cuprinde unele aspecte ale purificării microbiologice a apelor reziduale.

Capitolele sînt bogat ilustrate cu scheme, grafice, tabele, instalaţii tehnice schematizate etc., iar în final sînt însoţite de o bibliografie referitoare la principalele lucrări şi tratate de microbiologie generală şi tehnică, precum şi de un index pe materii.

Menţionăm totodată stilul concis, dar cuprinzător, folosit de către autor.

Lucrarea este de un real folos atît pentru studenţi, cărora de fapt li se adresează, cît şi pentru specialiştii şi cadrele de cercetare interesate în multiplele şi variatele aplicaţii practice ale microbiologiei.

S. Vasu
Institutul de biochimie
Bucureşti

Results and problems in cell differentiation (Rezultate și probleme în diferențierea celulară), vol. 2, editori J. Reinert și H. Ursprung, *Origine and continuity of cell organelles* (Originea și continuitatea organitelor celulare), Berlin-Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 342 p. + 135 fig.

Editura „Springer" a publicat în 1968 volumul *Stabilitatea stării diferențiate*, deosebit de bine primit în lumea științifică, ceea ce a determinat continuarea seriei cu acest al doilea volum, *Originea și continuitatea organitelor celulare*.

Tema generală a lucrării este încercarea de a răspunde la întrebările : cum apar organitele celulare și care sînt mecanismele care le asigură continuitatea? Ideea de bază este aceea a compartimentării prin membrane a activităților intracelulare. Ansamblul membranelor intracelulare, continuitatea și schimbul reciproc formează subiectul primului capitol. Conținutul lui evidențiază rolul-cheie al membranelor pentru structurile biologice.

Capitolul următor demonstrează strînsa legătură dintre mitocondrii și restul celulei, accentuînd semiautonomia genetică a acestor organite. Se discută apoi continuitatea plastidelor, procesele de diferențiere și mai ales implicațiile informației genetice cuprinse în plastide. Date interesante privesc filogenia plastidelor. Aparatul Golgi este unul dintre subiectele cel mai larg tratate în volum. Se descrie structura lui și funcțiile pe care le îndeplinește. Și în cazul aparatului Golgi există o oarecare ereditate extracromozomială, dar construcția *de novo* în fiecare generație e dirijată de gene nucleare.

În capitolul consacrat sistemului vacuolar, autorul încerarcă un răspuns, sugerînd o eventuală legătură cu reticulul endoplasmatic (pentru vacuolele vegetale) sau aparatul Golgi (pentru cele animale). Autorul aduce dovezi infrastructurale și citoenzimologice în favoarea unei apropieri între vacuolele vegetale și lizozomii din celulele animale. Totuși, diferențele morfologice, cu consecințele funcționale și mecanice respective, fac din vacuole structuri specifice plantelor. Problemele legate de centrioli sînt diverse. Sînt prezentate date sigure asupra morfologiei și morfogenezei acestor formații. Există însă incertitudini privind ereditatea, funcțiunea și evoluția centriolilor. Microtubulele au fost recunoscute drept constituenți ai celulelor eucariote abia în ultimii ani, dar există deja dovezi ale legăturii lor cu procesul de diferențiere a formei celulei și cu motilitatea celulară. Desmozomii nu sînt organite celulare propriu-zise, totuși existența lor e strîns legată de organizarea celulei și de activitatea ei genetică. Multe date referitoare la aceste aspecte sînt prezentate de autori în capitolul consacrat joncțiunilor celulare.

Volumul se încheie cu două capitole de respirație mai largă. Într-unul din ele se formulează ipoteza relației dintre endosimbioză și originea mitocondriilor și plastidelor ca urmare a asemănării lor cu procariotele și mai ales a paralelei ce se poate stabili între aceste organite și endosimbioretele actuale. În ultimul capitol se încearcă o privire de ansamblu asupra legăturii dintre organitele celulare și procesul de diferențiere a celulelor somatice vegetale.

Fie care capitol al volumului are o bibliografie proprie, iar ilustrația (electronomicrografii, scheme și grafice) este bogată și sugestivă. Asupra importanței acestei lucrări pentru cercetătorii din diferite domenii socotim că nu mai este nevoie să insistăm.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie București

Theoretical and clinical hemorheology, editată de H. H. Hartert şi A. L. Copley, Berlin-Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 411p. + 263 fig. (Lucrările prezentate la a 2-a Conferinţă internaţională a Societăţii internaţionale de hemoreologie, sub auspiciile Universităţii din Heidelberg, R. F. a Germaniei, 27 iulie — 1 august 1969).

Lucrările prezentate la Conferinţa internaţională de hemoreologie apar pentru prima dată în volum separat, rezumatele fiind publicate în revista „Biorheology" (vol. 6, nr. 4, aprilie 1970), organul oficial al Societăţii de hemoreologie.

Cele cinci capitole ale cărţii cuprind 47 de lucrări, semnate de cercetători hemoreologi renumiţi, dintre care citäm pe următorii : G.W.S. Blair, W. M. Price, J. A. Roesty, T. K. Hung (Anglia) ; J. Aroesti, J. F. Gross, G. Bugliarello, A. H. Sacks, S. Usami, R. J. Dellenbaok, A. L. Copley, R. L. King, P. Didisheim, C. A. Owen (U.S.A.) ; S. Oka, Y. Isola, M. Abe (Japonia) ; K. Hung, A. H. Goldsmith (Canada) ; E. Wetterer, Th. Kenner, N. N. Harter, A. M. Ehrly (R. F. a Germaniei) ; H. Hint (Suedia) ; L. Dintenfass (Australia) ; L. Lesner (Israel) ; J. F. Stoltz, A. Laroan (Franţa) ; P. Teitel (România).

Capitolul I, intitulat „Hemoreologia teoretică", cuprinde o serie de articole care tratează despre circulaţia în capilare a lichidelor nutritive şi difuzia lor în plasmă ; transferul de oxigen ; viscozitatea sîngelui ; aspectele chimice de suprafaţă etc. Sînt reprezentate grafic şi schematizate numeroase măsurători făcute în sistemul cardiovascular.

Capitolul II, „Hemoreologia experimentală", tratează despre viteza de curgere a circulaţiei pulsate (măsurătorile electromagnetice) ; rolul repulsiilor celulare mutuale în reologia suspensiilor celulare de eritrocite ; deformabilitatea eritrocitelor în timpul fixării în acetaldehidă ; influenţa fibrinogenului şi a globulinelor asupra reologiei sîngelui ; studiul prevenirii trombozei cu ajutorul Dipiridamolului ; AMP şi adenozinei ; stabilitatea suspensiilor de sînge şi efectul ATP, ADP, noradrenalinei, sulfatului de protamină şi heparinei asupra mobilităţii plachetelor sanguine umane etc.

Capitolul III, „Hemoreologia clinică", cuprinde o serie de lucrări care se referă la : coagularea dinamică a sîngelui la pacienţi cu hipertensiune, insuficienţă renală, tulburări arteriale periferice ; viscozitatea sîngelui şi plasmei în diferite boli ; agregarea şi deformabilitatea globulelor roşii etc.

În capitolul IV sînt descrise diferite metode hemoreologice, iar capitolul V este intitulat „Standarde şi terminologii".

Lucrarea se încheie cu note asupra medaliei „Poiseuille", instituită de Jean-Leonard-Marie Poiseuille, fizician şi fiziolog francez şi primul hemoreolog.

Natalia Moldoveanu
Institutul de biochimie Bucureşti

Handbuch der experimentellen Pharmakologie ; *Handbook of experimental Pharmacology*, editori : B. B. Brodie, J. R. Gillette ; editor ajutor : Helen S. Ackerman, vol. XXVIII, *Concepts in biochemical pharamacology*, Part. 2 (Manual de farmacologie experimentală, vol. XXVIII, Noţiuni de farmacologie biochimică partea a 2-a), Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 778 p. + 137 fig.

Editorii prefaţează prezentul volum cu formularea succintă a scopului apariţiei acestei lucrări : **„Acest manual de farmacologie experimentală (*Noţiuni de farmacologie biochimică*) va demonstra că, în sfîrşit, farmacologia a devenit o disciplină aparte cu drepturi proprii, disciplină care nu mai este o anexă a chimiei organice şi fiziologiei".**

Volumul cuprinde 38 de capitole, redactate de personalităţi binecunoscute în cercetarea problemelor de farmacologie. În funcţie de problematica abordată, capitolele componente sînt grupate în două secţiuni : „Metode de studiu al metabolismului medicamentelor" şi „Centrii metabolismului medicamentelor".

Metodele de studiu al metabolismului medicamentelor sînt incluse în două subsecţiuni. Prima, intitulată „Determinarea medicamentelor şi metaboliţilor lor", cuprinde opt capitole, dintre care spicuim : principii de bază ale metodelor de determinare a medicamentelor (B. B. Brodie), spectrofotometrie de absorbţie (R. P. Maickel, T. R. Bosin), fluorometrie (H. S. Ackerman, S. Undenfriend), determinări enzimatice în farmacologie (A. K. Cho), bioteste (M. Vogt). A doua subsecţiune se referă la identificarea metaboliţilor medicamentelor. Aceasta cuprinde 4 capitole, dintre care menţionăm : cromatografia pe hîrtie, pe coloană şi în strat subţire ; distribuţia în contracurent şi electroforeza (E. O. Titus), gaz cromatografia, spectrometrie de masă (A. M. Guarino, H. M. Fales), aplicaţiile diferitelor tipuri de spectroscopie la identificarea metaboliţilor medicamentelor (P. Bommer, F. M. Vane).

Prezentarea celei de-a doua secţiuni a lucrării „Centrii metabolismului medicamentelor", începe cu o introducere în problemă, redactată de R.T. Williams. Sînt trecute în revistă în mod succint, dar complet, principalele reacţii (oxidări, reduceri, hidrolize şi conjugări) care însoţesc etapele metabolismului medicamentelor.

În continuare, materialul cuprins în această a doua secţiune a cărţii este grupat în două subsecţii : enzime microzomale şi enzime nemicrozomale. Subsecţia „Enzime microzomale" conţine 14 capitole, dintre care enumerăm : unele caracteristici morfologice ale reticulului endoplasmatic al celulelor hepatice şi unele relaţii dintre reticulul endoplasmatic, microzomi şi metabolismul medicamentelor (J. R. Fouts) ; citocromul P—450, funcţia lui în metabolismul oxidativ al medicamentelor (R. W. Estabrook) ; enzime N-oxidante (J. H. Weisburger, Elizabeth K. Weisburger) ; enzime reductive (J. R. Gillette). În a doua subsecţie, „Enzime nemicrozomale", cuprinzînd 9 capitole, sînt prezentate o serie de probleme ca, de exemplu, esterazele ţesuturilor umane (B. N. La Du, H. Snady), aminooxidaze (E. A. Zeller), enzime transferante de grupări metil în metabolismul compuşilor fiziologic activi şi al medicamentelor (J. Axelrod).

Remarcăm ca deosebit de utile indicaţiile bibliografice, numeroase şi incluzînd şi titlurile articolelor, care însoţesc fiecare capitol al prezentului volum. Lucrarea, editată în condiţii grafice excepţionale, se încheie cu un index de autori şi un index de subiecte.

Prin tematica abordată şi prin modul sistematic de prezentare al problemelor, această lucrare este necesară din punct de vedere teoretic şi practic farmaciştilor, chimiştilor şi biologilor interesaţi în studiul acţiunii medicamentelor.

Doina Popov
Institutul de biochimie Bucureşti

Progress in molecular and subcellular biology (Progrese în biologia moleculară şi subcelulară), editor F. E. Hahn, vol. 2, *Complexes of biologically active substances with nucleic acids and their modes of action* (Complecşi ai substanţelor biologic active cu acizii nucleici şi modurile lor de acţiune), Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 400 p. +158 fig.

Acest volum cuprinde lucrările unui simpozion internaţional ţinut la Washington în 1970. El prezintă rezultatele unor cercetări asidue efectuate în ultima decadă pentru elucidarea

unor probleme ale formării şi structurii complecşilor dintre moleculele mici, biologic active, şi acizii nucleici, precum şi ale efectelor lor biologice, biochimice şi farmacologice.

Atenţia este concentrată în special asupra studiului modului şi mecanismului de acţiune al unor medicamente clinice şi experimentale care formează complecşi cu acizii nucleici, mai ales cu ADN, şi astfel îşi manifestă efectele antiprotozoariene, antebacteriene, antivirale sau antineoplastice. Aceste cercetări sînt partea cea mai avansată a unei noi ramuri, farmacologia moleculară, al cărei scop este fundamentarea experimentală a vechii concepţii empirice despre structură-acţiune, relativă la rolul medicamentelor.

În volum sînt prezentate medicamente din clasa antibioticelor, antimalarienelor, alte cîteva medicamente şi coloranţi sintetici. Este evidenţiat mecanismul prin care antibioticele inhibă replicarea ADN şi transcripţia ARN, sinteza lanţului polipeptidic în diferitele ei etape. Antimalarienele modifică apreciabil structura ADN, activitatea unor enzime din sistemul de sinteză al acizilor nucleici şi proteinelor, dintre care notăm aminoacil-ARN_t-sintetaza.

Lucrări interesante vizează efectul mutagenic al aminoacridinelor sau al bromurii de etidiu, care se datorează legării acestor substanţe de ADN. Aceleaşi substanţe pot acţiona însă şi ca antimutagene. Aceste cercetări par să deschidă o nouă etapă în chemoterapia practică, prin administrarea simultană a antimutagenului şi a medicamentului chemoterapeutic, pentru a se evita apariţia mutanţilor microbieni rezistenţi la medicamentul respectiv.

În ultimii ani s-a stabilit că multe substanţe carcinogene complexează ADN. Lucrările din acest domeniu încearcă să elucideze mecanismele carcinogenezei chimice şi natura leziunilor genetice care duc la neoplazie. Lămurirea acestor probleme ar fi o condiţie necesară pentru sinteza în viitor a unor medicamente antineoplastice eficace.

În volum se mai află o categorie de lucrări care pleacă de la ideea că substanţele sintetice ce se complexează cu ADN şi care împiedică transcripţia ARN sînt în fond modele de represori genetici. Studiind, aşadar, aceste complexe, se pot obţine cunoştinţe importante pentru biologia moleculară.

O altă problemă derivată şi tot atît de importantă este elucidarea structurii naturale a ADN şi a mecanismelor reale de expresie genetică.

Tabelele şi figurile sugestive, ca şi indexul de subiecte, uşurează parcurgerea volumului. Tematica acestei lucrări prin implicaţiile ei aplicative şi fundamentale, este interesantă deopotrivă pentru medici, farmacologi şi cercetători.

Constanţa Muşolan
Institutul de biochimie, Bucureşti

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band XXXII/1, *Insulin* (Tratat de farmacologie experimentală; vol. XXXII/1, Insulina), ed. E. DÖRZBACH, Berlin—Heidelderg—New York, Springer-Verlag, 1971, 434 p.

Monografia insulinei conţine un bogat material experimental, grupat în 11 capitole şi prelucrat de un mare număr de specialişti.

În prima parte a tratatului se face o prezentare a morfologiei comparate a insulelor lui Langerhans la vertebrate; capitolul conţine nomenclatura celulelor din insule, aspecte morfologice ale mecanismului de secreţie al celulelor B şi date citologice asupra insulelor atît la

vertebratele inferioare, cît şi la mamifere. Histologia, histochimia şi datele de microscopie electronică ale insulelor la om sînt descrise de Kief şi Engelbart; aceiaşi autori se ocupă de morfologia patologică a insulelor în diabetul mellitus la om.

Problema celulelor de insule în culturi de ţesuturi este expusă de Hilwig şi Schuster; se descriu atît metodele de lucru, cît şi modul de creştere a culturilor organotipice. Aspectele legate de pancreatectomie la diverse specii animale sînt analizate de P. Foà. Un capitol important este consacrat producerii experimentale a diabetului cu ajutorul unor substanţe chimice şi sensibilităţii diferitelor specii animale la inducerea experimentală a diabetului; în continuare, Brunk prezintă date asupra diabetului spontan la animale.

Structura, proprietăţile şi sinteza insulinei sînt expuse de Klostermeyer şi Zahn; de biosinteza insulinei se ocupă Humpel.

Capitolul referitor la acţiunea clinică a preparatelor de insulină (Schöffling şi Müller) prezintă metodele de caracterizare a diferitelor preparate de insulină; sînt descrise amănunţit diferite preparate comerciale de insulină.

Ultimul capitol, referitor la morfologia leziunilor cerebrale induse de insulină (Krämer şi Ostertag), conţine date clinice, morfologice şi electroencefalografice, precum şi o serie de considerente biochimice.

Bibliografia se găseşte la sfîrşitul fiecărui capitol; monografia conţine 118 figuri, un index de autori şi unul tematic. Este în curs de apariţie al doilea volum al tratatului despre insulină.

Gabriela Dinescu
Institutul oncologic Bucureşti

Antianginal Drugs (Medicamente contra anginei), ed. R. CHARLIER, Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 442 p.

Volumul prezintă în cinci capitole bazele fiziopatologice, hemodinamice, metodologice, farmacologice, biochimice şi clinice ale medicamentelor utilizate în terapia anginei.

După o introducere, în care autorul face un scurt istoric al descoperirii şi perfecţionării acestor preparate, se prezintă consideraţii generale asupra aterosclerozei; se analizează epidemiologia acestei afecţiuni, aspecte clinice, măsuri terapeutice generale şi tratamentul factorilor determinanţi.

Capitolul referitor la fiziopatologia anginei pectorale cuprinde o descriere a atacului anginal, dinamica cardiacă şi rolul jucat de hipersimpaticotonie în timpul lui, de asemenea modele experimentale folosite în farmacologie pentru lărgirea gamei de medicamente contra anginei. Studiul bazei hemodinamice a farmacologiei coronariene analizează o serie de factori, ca presiunea sanguină, ritmul cardiac, consumul de oxigen al miocardului şi reglarea circulaţiei coronariene.

Capitolul III cuprinde metodologia farmacologică folosită pentru testarea medicamentelor antiangină, iar metodele clinice utilizate pentru determinarea valorii terapeutice a tratamentelor contra anginei constituie subiectul capitolului IV.

Ultimul şi cel mai dezvoltat capitol tratează despre trăsăturile farmacologice şi clinice ale medicamentelor folosite în tratamentul anginei; se analizează aproximativ 50 de substanţe. Acest capitol este completat cu trei secţii, dintre care prima se ocupă de unele preparate recomandate pentru tratamentul anginei, dar care sînt prea recente pentru a se putea trage o con-

cluzie; a doua secţie se referă la substanţe cu efect slab sau al căror efect a fost ameliorat prin medicaţii mai recente, iar a treia la substanţe utilizate ca vasodilatatori periferici şi care pot îmbunătăţi circulaţia coronariană. Capitolul este completat cu o tabelă conţinînd principalele efecte exercitate la om de medicamentele antiangină mai larg utilizate.

Monografia se încheie cu o bogată bibliografie (peste 2 600 de indicaţii); conţine un index de autori şi unul tematic.

Gabriela Dinescu

Institutul oncologic Bucureşti

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band XXIX, *Oral wirksame Antidiabetika* (Tratat de farmacologie experimentală, vol. XXIX, Medicamente antidiabetice active pe cale orală), ed. H. MASKE, Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 732 p. +103 fig.

Descoperirea în 1955 a sulfamidelor care produc scăderea glicemiei a dus la o stimulare intensă a cercetărilor în domeniul fiziologiei insulelor lui Langerhans şi al metabolismului glucidic; s-a stabilit că mecanismul de acţiune al acestor substanţe se bazează pe stimularea secreţiei de insulină. Volumul se ocupă de aspectele chimice, biochimice, farmacologice şi clinice ale tuturor claselor de substanţe folosite în terapia diabetului; materialul, grupat în nouă capitole, este redactat de un colectiv de specialişti.

Aumüller şi Heerdt tratează despre relaţia structură-activitate în cazul derivaţilor de sulfaniluree şi al compuşilor înrudiţi; în continuare, Häussler şi Pechtold se ocupă de aspectele analitice ale acestor substanţe, şi anume proprietăţi fizice, spectrometrie, metode analitice calitative şi cantitative. Tot Häussler expune date legate de metabolismul sulfamidelor antidiabetice, ca metode analitice specifice, comportare, resorbţie, distribuţie în organism, nivel sanguin şi fixare de proteine. Farmacologia şi toxicologia substanţelor din această clasă sînt prezentate de Bänder. Acelaşi autor semnează un capitol în care se descriu alte categorii de substanţe cu acţiune antidiabetică.

Efectul antidiabeticelor orale asupra biosintezei proteinelor şi a numeroase enzime este expus de Sund; datele biochimice sînt completate cu date furnizate de microscopia optică şi electronică.

O altă clasă de substanţe antidiabetice o constituie biguanidele; se prezintă atît date experimentale (R. Beckmann), cît şi clinice (Mehnert şi Haese) obţinute în studiul lor.

Bibliografia se găseşte la sfîrşitul fiecărui capitol; monografia conţine un index de autori şi unul tematic.

Lucrarea prezintă un interes deosebit pentru toţi cercetătorii care se ocupă de diabet.

Gabriela Dinescu

Institutul oncologic Bucureşti

Chemistry of fungicidal action (Chimia acțiunii fungicidelor), ed. R. J. Lukens, Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 138 p.

Combaterea fungilor este o problemă esențială pentru agricultură, industrie și medicină, fapt pentru care folosirea fungicidelor se bucură de o aplicare din ce în ce mai largă. Întrebuințarea acestor substanțe necesită o înțelegere profundă a acțiunii lor, tradusă, de regulă, prin inhibarea creșterii, sporulării, respirației și altor procese fiziologice ale ciupercii.

Volumul 10 din seria „Biologie moleculară, biochimie și biofizică" este o amplă monografie asupra fungicidelor, bazată pe o literatură vastă de farmacologie și patologie a plantelor. Autorul, de-a lungul a nouă capitole, tratează aspecte multiple ale acțiunii fungicidelor, printre care : reacțiile lor cu constituenții celulari, relațiile dintre activitate și structură, migrarea de la locul de acțiune, măsurarea fungitoxicității și altele. Sînt atinse concepțiile recente de biologie celulară, arătîndu-se implicațiile sistemelor enzimatice profund afectate de fungicide. S-a constatat că cele mai frecvent atacate sînt grupările tiol, amino și carboxil din constituția componenților celulari.

Lucrarea, completată cu un capitol special care redă structura și caracteristicile unor fungicide, se încheie cu o listă cuprinzătoare a indicațiilor bibliografice și un index de subiecte.

Considerăm că prin multitudinea problemelor tratate volumul de față este de un real folos celor care vin în contact cu diverse probleme ale atacului ciupercilor, înarmîndu-i cu prețioase cunoștințe.

Ioana Hagima-Călin
Institutul de biochimie, București

Lectures on developmental physiology (Prelegeri asupra fiziologiei dezvoltării), ed. Alfred Kühn Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 534 p. +620 de ilustrații

Volumul este o traducere în limba engleză a celei de-a II-a ediții a cursului *Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie*, forma scrisă a unui curs ținut de prof. A. Kühn, timp de mai mulți ani, la Göttingen și la Tübingen ; acest lucru se reflectă în modul de ilustrare și în faptul că o mare parte din detaliile fiecărei probleme sînt asamblate într-o structură clară și ușor accesibilă. Volumul cuprinde 36 de prelegeri.

În introducere se prezintă problemele fundamentale ale fiziologiei dezvoltării. Urmează o serie de prelegeri consacrate cromozomilor : structură bazică și transformări, arhitectură și compoziție chimică, modificări legate de starea celulei și de compoziția genomului, aparatul de distribuție cromozomial. Diviziunea celulară este amănunțit descrisă la celule de protozoare vegetale și animale. Autorul se ocupă de problemele dezvoltării la echinoide și la amfibii, analizînd vegetalizarea și animalizarea embrionilor de echinoide, morfogeneza sistemului nervos la amfibii, cercetările biochimice asupra embrionilor de echinoide și amfibii.

Parte din prelegeri se ocupă de evoluția organizării în formarea oului a unor organe ; se descrie modul în care se face determinarea planului structural la insecte, ca și dezvoltarea lor postembrionară.

În cadrul proceselor evolutive la plante, autorul analizează aspecte legate de diferențierea țesuturilor, hormoni, fitohormoni, diviziune.

Capitolele care tratează despre procesele de diferențiere cuprind date referitoare la fenomenele morfogenetice în culturi de țesuturi, materialul ereditar, efecte ale mutațiilor, fiziologia dezvoltării și natura evoluției. Volumul se încheie cu un capitol consacrat rolului genelor în dezvoltare, problemei determinării, factorilor ereditari; se discută de asemenea o serie de probleme nerezolvate încă.

Volumul cuprinde un material extrem de bogat, cu exemple luate din cele trei mari sectoare, animal, vegetal și protozoare, precum și o listă de 762 de indicații bibliografice, un index de autori, unul tematic și unul sistematic.

Gabriela Dinescu
Institutul oncologic București

Haut als endokrines Erfolgsorgan; Gestagene; geriatrische Endokrinologie des Mannes (Pielea ca organ endocrin țintă; substanțe gestative; endocrinologia geriatrică a bărbatului), ed. prof. dr. Joachim KRACHT, Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1971, 196 p. + 84 fig.

Volumul conține lucrările celui de-al 17-lea Simpozion al Societății germane de endocrinologie, care a avut loc la Hamburg între 4 și 6 martie 1971. Această societate are posibilitatea de a premia lucrările mai valoroase; în 1971 au fost premiate lucrările *Steroidglucuroniltransferaza* de G. Rao și *Metodă de determinare a aldosteronului plasmatic* de D. Scholer, care au fost prezentate la începutul simpozionului.

Materialele simpozionului au fost împărțite în trei grupe; prima grupă conține referate despre acțiunea hormonilor asupra pielei, și anume metabolismul testosteronului în piele, efectul hormonilor steroizi asupra pielei, aspecte clinice ale acțiunii steroizilor asupra pielei, pătrunderea prin piele a hormonilor sexuali steroizi etc.

În cadrul celei de-a doua grupe, referitoare la aspecte moderne ale substanțelor gestative, au fost prezentate o serie de referate, ca fiziologia și fiziopatologia funcțiunii corpului galben, metabolismul și acțiunea substanțelor gestative sintetice, date noi în terapia cu substanțe gestative.

A treia grupă a cuprins referate despre unele aspecte moderne ale endocrinologiei geriatrice a bărbatului, și anume rezultate recente obținute în studiul efectelor și al metabolismului hormonilor în prostată, puncte de vedere noi ale terapiei neoplaziilor benigne și maligne ale prostatei, influența vîrstei asupra funcțiunilor endocrine ale bărbatului.

În cadrul simpozionului au avut loc și două mese rotunde, în care s-au discutat probleme legate de efectele secundare ale terapiei cu substanțe gestative și de *climacterium virile*. În încheierea lucrărilor, un colectiv de specialiști a prezentat o clasificare a maladiilor glandei tiroide.

Volumul prezintă un interes deosebit atît pentru clinicieni, cît și pentru chimiștii care se ocupă de chimia și de biochimia hormonilor.

Gabriela Dinescu
Institutul oncologic București

S. S. SANBAR, *Risikofaktor Hyperlipidämie* (Hiperlipidemia, factor de risc), Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, 1972, 112 p. +21 fig.

Volumul care constituie obiectul prezentei recenzii reprezintă traducerea germană, efectuată de P. Schwandt, a originalului englez apărut în 1969 cu titlul *Hyperlipidemie and Hyperlipoproteinemie.*

Autorul, profesor de medicină internă la Facultatea de medicină a Universității din Michigan, sintetizează în volumul de față literatura vastă referitoare la bazele teoretice și clinice ale hiperlipidemiei și hiperlipoproteinemiei.

Materialul este împărțit în 11 capitole. Titlurile acestora ilustrează cu claritate conținutul cărții: Modificări ale lipoproteinelor serice; Lipide serice; Lipoproteine serice; Defecte biochimice în cazuri de hiperlipoproteinemie; Hiperlipoproteinemii secundare; Hiperlipoproteinemii familiare de tip I, II, III, IV și V. Ultimul capitol, intitulat „Sindromul hiperlipoproteinemiei" constituie de fapt un rezumat al întregii lucrări. Volumul se încheie cu un indice.

Remarcăm ilustrarea grafică a cărții cu tabele, figuri și fotografii ale aspectelor clinice. Fiecare capitol este completat de o listă bibliografică (multe dintre lucrările citate sînt publicate în 1970).

Prin concizia stilului și prin îmbinarea armonioasă a părții medicale a cercetărilor cu cea chimică, volumul de față este un valoros îndreptar atît pentru medicii clinicieni, cît și pentru biochimiștii de laborator.

Doina Popov
Institutul de biochimie, București

Z. KIRÁLY și L. SZALAY-MARZSÓ, *Symposium on the biochemical and ecological aspects of plant-parasite relations* (Simpozion asupra aspectelor biochimice și ecologice ale relațiilor plantă-parazit), Budapesta, Académiai Kiadó, 1970, 425 p.

Simpozionul s-a ținut cu ocazia celei de-a 90-a aniversări a Institutului ungar de cercetări pentru protecția plantelor, Budapesta, 28 septembrie—1 octombrie 1970.

Lucrarea cuprinde materiale prezentate la acest simpozion, grupate în patru părți după tematica abordată.

În prima parte sînt redate studii legate de reacțiile de apărare ale plantei, rolul echipamentului enzimatic, particularitățile sintezei proteice în țesuturile plantelor infectate etc.

Lucrările din a doua parte se ocupă cu diferite aspecte ecologice ale paraziților, cum sînt rolul unor factori ca temperatura, calitatea hranei, fotoperiodismul și alții asupra dezvoltării diferiților paraziți.

În lucrările grupate în partea a treia a lucrării, autorii analizează relațiile privind controlul endocrin al dezvoltării insectelor, analiza factorilor care influențează fecunditatea și fertilitatea unor paraziți, controlul genetic etc.

Lucrările din partea a patra a lucrării tratează probleme legate de activitatea și de mecanismul unor fungicide noi, ca dimetirimol, etirimol, plantvax, vitavax, benlat și altele, acțiunea antifungală a unor derivați ai acidului ditiocarboxilic, studii comparative în plante și animale.

Lucrările sînt însoțite de grafice clare, formule structurale ale unor fungicide, tabele cuprinzătoare, hărți exprimînd arealul de răspîndire al unor agenți patogeni, fotografii comparative între varietățile sensibile și cele rezistente la diferite infecții, secțiuni în organele plantelor atacate. Un ajutor în plus celor care se ocupă cu protecția plantelor îl constituie listele bibliografice bogate inserate la sfîrșitul fiecărei lucrări. Noutatea datelor prezentate, ca și importanța actuală a luptei impotriva unor paraziți agricoli, conferă lucrării un deosebit interes.

Ioana Hagima-Călin
Institutul de biochimie, București

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate, apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în biobliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, sectorul 1.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

E. MACOVSCHI, **Biostructura**, 1969, 258 p., 18,50 lei.
M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.
R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 375 p. + 8 pl., 26 lei.
M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., + 18 pl., 27 lei.
ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.
* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 628 p. + 2 pl., 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 —. Toute commande à l'étranger sera adresée a Întreprinderea Rompresfilatelia, Boite postale 2001 — telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 15, Nr. 3, P. 239–336, BUCUREŞTI, SEPTEMBRIE, 1972

I. P. „Informaţia" – c. 1539 | 43816 | Lei 20.–

1972 SEP 15

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

4

TOMUL 15

1972

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 4, p. 337—444, Bucureşti, decembrie 1972

SCBIA5 — 15 (4), 337—444 (1972)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; N. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuța poștală 2001 — telex 011631, București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, str. Docenților nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, str. Gutenberg nr. 3 bis, sectorul 6

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 15, nr. 4 1972

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Institutul de biochimie după 20 ani de la inaugurare . . 341
E. MACOVSCHI, Evoluţia cercetărilor la Institutul de biochimie în perioada 1952—1972 343
TR. RĂDULESCU, D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, C. MEDEŞAN, L. SCOLNIC şi TR. BENŢIA, Cercetări de biochimie musculară 347
M. ŞERBAN, D. COTARIU şi C. IORDACHE, Cercetări în domeniul biochimiei comparate 359
V. GHEŢIE, C. MOTAŞ, S. MIHĂESCU, C. SARMANIOTI şi D. ONICĂ, Cercetări de imunochimie 369
E. MACOVSCHI, V. ELEFTERESCU, I. CORNOIU, C. MUŞOLAN şi O. GOZIA, Biostructura, o nouă concepţie despre alcătuirea materiei vii şi cercetările din acest domeniu 377
V. ALEXANDRESCU, L. BUZILĂ, D. POPOV, I. HAGIMA-CĂLIN şi F. MIHĂILESCU, Cercetări în domeniul biochimiei plantelor 391
S. VASU, L. BOTOŞENEANU, S. RĂDULESCU şi ŞT. HULEA, Cercetări în domeniul acizilor nucleici şi al nucleazelor 401
H. D. SCHELL şi M. CÂRSTEANU, Metode şi tehnici de cercetare elaborate în Institutul de biochimie 409
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE DE CADRELE INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE ÎN PERIOADA 1952—1972 417

INDEX DE AUTORI 439
INDEX DE LUCRĂRI PE SPECIALITĂŢI 443

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 4, p. 337—444, Bucureşti, decembrie, 1972

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tome 15, no. 4 1972

CONTENTS

Page

E. MACOVSCHI, Institute of Biochemistry after 20 years from its opening . . . 341
E. MACOVSCHI, Development of the investigations at the Institute of Biochemistry in the period 1952—1972 343
TR. RĂDULESCU, D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, C. MEDEŞAN, L. SCOLNIC, T. BENŢIA, Studies of muscular biochemistry 347
M. ŞERBAN, D. COTARIU, C. IORDACHE, Studies in the field of comparative biochemistry 359
V. GHETIE, C. MOTAŞ, S. MIHĂESCU, C. SARMANIOTI, D. ONICĂ, Imunochemical studies 369
E. MACOVSCHI, V. ELEFTERESCU, I. CORNOIU, C. MUŞOLAN, O. GOZIA Biostructure, a new conception upon living matter make-up and investigations in this field 377
V. ALEXANDRESCU, L. BUZILĂ, D. POPOV, I. HAGIMA-CĂLIN, F. MIHĂILESCU, Studies in the field of plant biochemistry 391
S. VASU, L. BOTOŞENEANU, S. RĂDULESCU, ŞT. HULEA, Studies in the field of nucleic acids and nucleases 401
H. D. SCHELL, M. CÂRSTEANU, Investigation methods and techniques advanced at the Institute of Biochemistry 409
LIST OF THE PAPERS PUBLISHED IN THE PERIOD 1952—1972 BY THE RESEARCH WORKERS OF THE INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY 417

AUTHOR INDEX 439
SUBJECT INDEX 443

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 4, p. 337—444, Bucureşti decembrie 1972
str. Gutenberg nr. 3 bis, sectorul 6

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 341–342 (1972)

INSTITUTUL DE BIOCHIMIE DUPĂ 20 ANI DE LA INAUGURARE

Acad. E. MACOVSCHI

În 1952, în prezența academicienilor C.I. Parhon, președinte de onoare al Academiei R.P.R., Traian Săvulescu, președintele Academiei R.P.R., precum și a altor personalități științifice de seamă, a fost inaugurat Institutul de biochimie al Academiei.

Printre sarcinile trasate institutului pot fi menționate : inițierea și dezvoltarea cercetărilor de biochimie animală și vegetală, formarea cadrelor de biochimiști specializați în aceste domenii și publicarea primelor reviste de biochimie din țara noastră.

Fără a insista asupra dificultăților inerente începutului, constatăm că în decursul celor 20 ani de existență Institutul de biochimie a desfășurat o vie activitate de cercetare științifică și a ajuns la o serie de realizări importante.

Evoluția cercetărilor biochimice face obiectul referatelor publicate în acest număr al revistei. Prin aceste cercetări s-au adus numeroase contribuții originale în problemele privind biochimia musculară, biochimia comparată, imunochimia, teoria biostructurii, biochimia germinării, biochimia acizilor nucleici și a nucleazelor, metodele și tehnicile de cercetare, precum și în alte domenii. Această activitate se oglindește și în lista lucrărilor elaborate în cadrul institutului, anexată la referate.Cifrele din cuprinsul referatelor (puse între paranteze rotunde) indică numărul lucrărilor respective din această listă.

Ca realizări aplicative se pot menționa :

— 15 metode originale cu aplicații în agronomie și medicină ;

— 1 procedeu de sporire a cantității vitaminei C în legume ;

— preparate enzimatice cu aplicații în laboratorul de analize medicale, în industria alimentară și în vinificație ;

— produși sintetici din domeniul relaxanților musculari, aplicabili în chirurgie ;

— 7 brevete de invenții ;

— 3 brevete de inovații.

În ultimul timp s-a dat o atenție deosebită încheierii contractelor de cercetare cu instituțiile productive. Astfel, în 1970 am avut contracte în valoare de 100 000 de lei, în 1971 de peste 600 000 lei, iar în 1972 s-a ajuns la 1 000 000 de lei.

Prin grija institutului sînt editate primele două reviste românești de biochimie: „Studii și cercetări de biochimie", începînd din 1958, și „Revue roumaine de Biochimie", începînd din 1964. Cu aceste reviste se

face un schimb cu peste 460 de instituţii de specialitate de peste hotare din 48 de ţări.

Publicaţiile institutului sînt apreciate şi căutate în străinătate; dovada o constituie numeroasele cereri de extrase şi citarea frecventă a multor cercetări ale institutului în lucrările publicate de diferiţi autori în revistele de peste hotare.

Biblioteca institutului, care dispunea în 1950 de un fond de cărţi şi de reviste de numai 5 000 de volume, a ajuns în ultimul timp la un fond care depăşeşte 20 000 de volume.

La Institutul de biochimie s-au format numeroase cadre de specialişti, dintre care unii au fost solicitaţi să treacă la alte institute de cercetări precum şi în instituţiile de învăţămînt superior. Este semnificativ şi faptul că în 1952 printre cercetătorii institutului doar doi aveau titlul de doctor, iar acum, pe lîngă numeroşi doctori, sînt şi doi doctori docenţi, cu dreptul de a conduce teze de doctorat. De asemenea este de menţionat că în cadrul institutului şi-au susţinut pînă acum teze de doctorat 22 de cercetători din învăţămîntul superior şi din alte institute.

Tot la Institutul de biochimie au făcut stagii de specializare numeroşi cercetători din alte institute, atît din ţară, cît şi din străinătate.

La institut s-a desfăşurat şi se desfăşoară şi o prodigioasă activitate didactică prin ţinerea de lecţii şi de conferinţe de specialitate seriilor de studenţi ce se repartizează institutului pentru practica de vară şi prin sprijinirea studenţilor în efectuarea cercetărilor ştiinţifice legate de elaborarea tezelor de licenţă.

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 343–346 (1972)

EVOLUȚIA CERCETĂRILOR LA INSTITUTUL DE BIOCHIMIE ÎN PERIOADA 1952—1972

Acad. E. MACOVSCHI

În 1952, odată cu înființarea, Institutul de biochimie a primit sarcina de a iniția și dezvolta cercetări atît în domeniul biochimiei animale, cît și în cel al biochimiei vegetale.

În domeniul biochimiei animale, cercetările au început prin continuarea și aprofundarea unor investigații pe care le-am pornit în 1930 la Universitatea din Cluj și pe care le-am dezvoltat apoi în două direcții diferite în timpul cît am lucrat la Politehnica din Timișoara (1939—1940) și în perioada 1940—1952 a activității mele de la Universitatea din București.

Una dintre aceste direcții a fost biochimia și excitabilitatea sistemului neuromuscular, care a necesitat sinteza atît a substanțelor curarizante de tip clasic, cît și a compușilor derivați ai fluorenului și ai stilbenului. Sperăm că cercetările efectuate în acest domeniu vor duce la cunoașterea tot mai bună a excitabilității materiei vii și deci a naturii acestei materii.

Cealaltă direcție privea problema naturii și a structurii materiei vii, iar cercetările pe care le-am efectuat s-au caracterizat prin abordarea paralelă a aspectelor problemei care păreau de cea mai mare perspectivă. Astfel, paralel cu investigarea excitabilității sistemului neuromuscular, am urmărit ani de-a rîndul permeabilitatea membranelor vii, avînd în vedere că, după teoria membranei, acestor membrane le revine rolul esențial în manifestarea fenomenelor vieții.

Începînd din 1952, continuarea cercetărilor în ambele direcții a trecut în sarcina Institutului de biochimie.

Aprofundarea investigațiilor în problema biochimiei și a excitabilității sistemului neuromuscular a impus cunoașterea tot mai completă a proteinelor musculare și cerebrale, a enzimelor și a reacțiilor enzimatice care se produc în mușchi și în creier, a rolului substanțelor macroergice și a ionilor cuprinși în mușchi, a reglării proceselor enzimatice, mai ales a glicolizei etc.

Cercetările menționate se efectuau la început pe animale de laborator : broaște, șoareci și cobai. Curînd însă a devenit necesară extinderea lor asupra altor animale : pești, reptile, păsări și chiar nevertebrate. Astfel s-a ajuns la diferențierea treptată a două domenii de cercetare, cuprinse în actuala tematică a institutului : *biochimia musculară* și *biochimia comparată*.

Paralel s-a conturat nevoia de caracterizare și de identificare mai exactă a proteinelor prin metode imunochimice, precum și abordarea unor probleme specifice acestei discipline. Aceasta a dus la apariția celui de-al treilea domeniu de cercetare, și anume *imunochimia*.

Nu vom insista asupra acestor trei domenii şi nici asupra evoluţiei cercetărilor efectuate în cadrul lor, deoarece aceasta constituie obiectul altor referate. În schimb, ne vom preocupa ceva mai mult de cercetările efectuate în institut în problema naturii şi a structurii materiei vii.

Cu toate că investigaţiile făcute în legătură cu excitabilitatea sistemului neuromuscular şi cu permeabilitatea membranelor vii, artificiale şi lichide ne-au dat o serie de rezultate interesante şi valoroase, totuşi ele nu ne-au permis să ajungem la concluzii noi cu privire la natura materiei vii. De aceea a trebuit să abordăm problema de pe alte poziţii. Or, tocmai pe atunci devenea cunoscută teoria originii vieţii pe Pămînt, după care coacervatele, prin evoluţia lor, au constituit puntea de trecere de la materia nevie la materia vie. Totodată se răspîndise ideea, susţinută de unii savanţi cu renume, cum că protoplasma vie ar fi ea însăşi un coacervat complex. Important a fost şi faptul că şcoala sovietică de biochimie a reuşit să demonstreze experimental posibilitatea includerii în coacervate a diferitelor enzime şi a urmăririi reacţiilor enzimatice în acest mediu coloidal. Se părea deci că coacervatele pot servi ca un model simplificat pentru dezlegarea diferitelor probleme legate de viaţa protoplasmei. În consecinţă, am pornit şi noi pe această linie, în speranţa că prin cercetarea coacervatelor şi a reacţiilor enzimatice în coacervate şi medii macroeterogene vom reuşi să realizăm unele progrese în cunoaşterea mai aprofundată a naturii şi a structurii materiei vii.

Investigaţiile făcute au dus însă la concluzia că, oricît de complexe ar fi coacervatele şi oricît de bine ar reuşi eventual coordonarea diferitelor reacţii biochimice în ele, cercetările respective nu vor contribui la dezlegarea problemelor vieţii. De aceea a apărut nevoia elaborării unei noi concepţii cu privire la natura şi la structura materiei vii. Premisele acestei concepţii, numită ulterior „concepţia biostructurală", s-au conturat în cursul anilor 1955—1959. Apoi, pe baza acestei concepţii, s-au efectuat o serie de investigaţii teoretice şi experimentale care au permis cristalizarea unui nou domeniu de cercetare intrat în tematica institutului, şi anume *biochimia materiei biostructurate*. Dar nici în cazul acesta nu vom insista asupra cercetărilor efectuate, deoarece ele sînt expuse într-un alt referat.

În domeniul biochimiei vegetale, cercetările au urmat un alt drum.

Odată cu înfiinţarea Institutului de biochimie, conducerea de atunci a Academiei ne-a sugerat iniţierea unor cercetări biochimice privind atît stimularea şi iarovizarea seminţelor plantelor de cultură, cît şi hibridarea vegetativă a plantelor.

În cadrul problemelor privind stimularea şi iarovizarea seminţelor plantelor de cultură s-a luat în considerare faptul că stimularea şi mai ales iarovizarea influenţează procesul germinării seminţelor, modificînd biochimismul acestora. Pornind de aici, s-a ajuns cu timpul la individualizarea celui de-al cincilea domeniu de cercetări, numit *biochimia germinării*.

În problema hibridării vegetative a plantelor s-au efectuat întîi unele investigaţii teoretice izvorîte din concepţia biostructurală despre natura şi structura materiei vii. Apoi s-a trecut la elaborarea unor metode de cercetare ţinînd seama că în hibridare acizilor nucleici le revine un rol fundamental. S-au mai luat în considerare şi nucleazele cu ajutorul cărora plantele pot hidroliza acizii nucleici străini ce se introduc în ele în

cursul cercetărilor. Toate acestea au contribuit la diferenţierea a încă unui domeniu de cercetare, şi anume *biochimia acizilor nucleici şi a nucleazelor*. Menţionăm că în acest domeniu investigaţiile s-au extins şi asupra microorganismelor.

Evoluţia cercetărilor biochimice efectuate în cele două domenii constituie obiectul unor referate aparte, aşa că nu insistăm aici asupra lor. În schimb, trebuie să adăugăm că, în decursul celor 20 de ani de existenţă a Institutului de biochimie, cercetările au necesitat adaptarea diferitelor metode de investigaţie experimentală atît la condiţiile de lucru din institut, cît şi la specificul problemelor abordate, şi — ceea ce este deosebit de important — au impus elaborarea unor metode noi de cercetare. Tot ceea ce s-a realizat pe această linie este prezentat în cadrul unui referat special.

★

Din cele de mai sus rezultă că cercetările Institutului de biochimie s-au axat pe anumite direcţii bine definite şi că evoluţia lor este oglindită în cele şapte referate alăturate.

Dar pe lîngă cercetările menţionate au mai fost efectuate şi altele, care nu sînt cuprinse în referatele amintite. Unele reprezintă investigaţii preliminare care au contribuit la conturarea domeniilor de cercetare din actuala tematică a institutului, iar altele s-au efectuat la solicitarea diferitelor instituţii; au fost şi cercetări prin care s-a urmărit tatonarea anumitor probleme noi etc.

Toate aceste cercetări pot fi grupate în:

— cercetări care au precedat elaborarea concepţiei biostructurale despre natura şi structura materiei vii. Din acest grup fac parte investigaţiile efectuate în domeniul permeabilităţii membranelor şi reacţiile în medii macroeterogene şi ale coacervatelor;

— cercetări privind stimularea şi iarovizarea seminţelor, hibridarea plantelor şi translocarea substanţelor în plante;

— cercetări de exosmoză;

— cercetări de enzimologie;

— cercetări care interesează medicina, fiziologia şi chimia organică.

În problema permeabilităţii membranelor (162), (173), (209) s-au publicat lucrări privind permeabilitatea membranelor lichide (150), (161), (164), (166), (226), (247), (359) şi influenţa diferitelor substanţe asupra acestei permeabilităţi (48), (201), (219). Cercetarea reacţiilor enzimatice în medii macroeterogene a format obiectul lucrărilor (2), (30), (96), (217), (218), (236), iar în domeniul coacervatelor s-au cercetat coacervate cu proteine native (168), (205), (297), (298), s-au investigat relaţiile dintre coacervate şi enzime (49), (199), (200), (360), (426) şi s-a urmărit comportarea coacervatelor în prezenţa anumitor substanţe (28), (248).

În legătură cu stimularea, iarovizarea şi hibridarea plantelor, precum şi în legătură cu translocarea substanţelor în organismul vegetal au fost publicate numeroase lucrări, şi anume: (3), (31), (89), (169), (202), (249), (403), (404), (447) privesc stimularea, (323), (446) iarovizarea, (97), (174), (176) hibridarea, iar (90), (91), (215), (216), (239), (250), (316) se referă la translocarea substanţelor în diferite plante.

Exosmoza diferitelor substanţe din materialul biologic viu poate da indicaţii cu privire la fenomenele biochimice care se produc în materialul respectiv (167). În acest cadru s-a cercetat exosmoza electroliţilor, aminoacizilor liberi şi substanţelor reducătoare din piele (50)—(53), (55)—(57), (85), (86), (207), din muşchi (351)—(353) şi din exocolul uterin (60), (310) în condiţii normale şi patologice, precum şi exosmoza electroliţilor (97), (232) şi a altor substanţe (202) din seminţele unor plante.

În domeniul enzimologiei s-au cercetat enzimele pectolitice din *Aspergillus* (427), (428), (429), (433), relaţiile dintre enzimele din coacervate (49), (199), (200), (360), (426), s-a urmărit oxidarea unor substanţe prin sistemul polifenoloxidazei din plante (449), (450), influenţa unor substanţe asupra reacţiilor enzimatice (29), (238), (329), (427), cinetica catalazei (165), prepararea hialuronidazei (204) etc. Se înţelege că aici nu sînt menţionate numeroasele cercetări enzimologice cuprinse în cadrul celorlalte referate.

În fine, menţionăm că pe parcurs s-a efectuat la institut şi un număr restrîns de cercetări biochimice care interesează medicina (163), (175), (191), (197), (275), fiziologia musculară (362)—(369) şi chimia organică (233)—(235), (240), (241), (243), (318).

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 347–357 (1972)

CERCETĂRI DE BIOCHIMIE MUSCULARĂ [1]

TR. RĂDULESCU, D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, C. MEDEȘAN, L. SCOLNIC și TR. BENȚIA

În cadrul biochimiei generale, biochimia musculară constituie unul din domeniile fundamentale, ceea ce justifică atenția deosebită ce i-a fost permanent acordată de biochimiști. Cercetările de biochimie musculară au fost inițiate la Institutul de biochimie încă din 1955, primele investigații avînd ca obiect problema excitabilității musculare. O contribuție în această direcție a fost adusă prin cercetarea acțiunii unor substanțe capabile să modifice excitabilitatea, cum sînt substanțele curarizante. Se știa că acestea acționează la nivelul membranelor postjuncționale, provocînd întreruperea transmisiei impulsurilor de la nerv la mușchi, dar mecanismul lor de acțiune nu era cunoscut în toată complexitatea lui. Pentru aceste motive investigațiile noastre au fost îndreptate în primul rînd în această direcție.

În continuarea cercetărilor noastre s-a acordat de asemenea o deosebită atenție diferitelor aspecte ale metabolismului muscular. În cele ce urmează vom face o scurtă prezentare a principalelor rezultate obținute.

1. CONTRIBUȚII LA STUDIUL MECANISMULUI DE ACȚIUNE AL SUBSTANȚELOR CURARIZANTE

Ca punct de plecare în aceste cercetări stă ipoteza Macovschi, care admite că, pentru a acționa la nivelul membranei postjuncționale (placa motrice), substanțele curarizante trebuie să se fixeze pe această membrană, care, ca orice membrană lipoproteică, se poate depolariza. Fixarea s-ar face prin gruparea lipofilă a moleculei, în timp ce sarcina pozitivă a atomului de azot cuaternar al grupării acvofile ar aduce perturbări în felul și repartiția sarcinilor electrice de pe suprafața acestei membrane. După această ipoteză, în acțiunea farmacodinamică a sărurilor cuaternare de amoniu intervine, printre altele, un anumit grad atît de lipofilie, cît și de disociație a acestor substanțe (253).

Pentru a verifica această ipoteză a fost necesar să se sintetizeze o serie de produși dotați cu grade diferite de lipofilie, necunoscuți în literatura de specialitate, aparținînd la diferite clase de substanțe. Astfel au fost obținuți derivați de la acidul și amida acidului nicotinic (231), de la unii alcaloizi (93), de la o-, m- și p-fenilendiamină, benzidină și o-

[1] Prescurtările folosite au următoarele semnificații : ATP = adenozin-5′-trifosfat ; ADP = = adenozin-5′-difosfat ; AMP = adenozin-5′-monofosfat ; GTP = guanozin-5′-trifosfat ; UTP = = uridin-5′-trifosfat ; ITP = inozin-5′-trifosfat ; G-1-P = glucoso-1-fosfat ; G-6-P = glucoso-6-fosfat ; F-1,6-P = fructozo-1,6-difosfat ; CP = creatinfosfat ; CK = creatinkinază ; MK = miokinază ; ATP-ază = adenozin-5′-trifosfatază ; LDH = lactatdehidrogenază ; M_4 = izoenzima LDH tip mușchi ; H_4 = izoenzima LDH tip inimă ; 2,4-DNP = 2,4-dinitrofenol ; FDNB = = 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen.

dianisidină (94), de la 2-aminofluoren şi 2,7-diaminofluoren (328), de la acetamido-benzalfluoren (324) şi de la benzalfluoren (325). În afara acestora s-au mai sintetizat noi săruri cuaternare de amoniu, avînd în moleculă unele structuri speciale, care, pe lîngă acţiunea curarizantă, le confereau anumite caracteristici în plus. Din această categorie fac parte atît substanţele de tip betainic, derivate de la peptide, capabile să se scindeze pe cale enzimatică, evitîndu-se astfel acumularea lor în organism (332), cît şi sărurile mono- şi dicuaternare derivate de la stilben, care, datorită fluorescenţei în ultraviolet, prezintă şi calitatea de substanţe trasoare. Studiul spectroscopic a arătat că ele sînt izomeri *trans* ai stilbenului (148). Prin iradierea în UV, ele trec în izomerul *cis* nefluorescent, concomitent cu slăbirea activităţii curarizante (445). O altă proprietate a derivaţilor stilbenici fluorescenţi este şi aceea de a forma complecşi doar cu anumite fracţiuni proteice ale proteinelor musculare sarcoplasmatice (335), (336), (338). Proteina obţinută prin scindarea complexului îşi păstrează activitatea biologică (LDH) avută anterior complexării (349). În mod similar se comportă atît proteinele serice (333), cît şi cele cerebrale (340). Aceşti derivaţi stilbenici inhibă total reacţiile glicolitice din muşchi (424).

Din categoria substanţelor curarizante trasoare fac parte şi derivaţii obţinuţi de la antrachinonă (326).

În afara celor peste 100 de produşi noi, au fost sintetizate două substanţe curarizante cunoscute : succinilcolina (95) (511) şi flaxedilul (512), folosite în cercetările noastre ca termeni de comparaţie. Dispunînd de aceste substanţe cu structuri şi grade de lipofilie diferite, s-a trecut la cercetarea lor complexă din punct de vedere farmacodinamic, fiziologic şi biochimic.

Rezultatele obţinute au arătat că unii derivaţi de la benzalfluoren, în comparaţie cu cei obţinuţi de la fluoren, prezintă o activitate curarizantă foarte intensă, de ordinul de mărime al d-tubocurarinei. Apare astfel evidentă relaţia dintre gradul de lipofilie şi activitatea curarizantă, dintre structură şi activitatea farmacodinamică (261), (262), (285), (467). De asemenea, cercetarea unor compuşi noi sintetizaţi a arătat că aceştia posedă acţiune antiacetilcolinică şi anticolinesterazică (279), (337). Este de remarcat că prezenţa în molecula sărurilor cuaternare de amoniu de grupări carboxilice şi peptidice micşorează efectul antiacetilcolinic, respectiv caracterul curarizant (151). Totodată s-a urmărit acţiunea unor substanţe curarizante uzuale (d-tubocurarina, succinilcolina şi flaxedilul) asupra carnozinei musculare (159).

Studiul relaţiei dintre gradul de lipofilie al moleculei şi activitatea curarizantă a mai fost efectuat şi pe un model experimental fizico-chimic. Astfel, cu ajutorul metodei polarografice s-a demonstrat că derivaţii de la benzidină, mai lipofili decît cei de la fenilendiamină, prezintă o activitate interfacială mai mare şi o activitate curarizantă mai accentuată, şi invers (253)—(256).

S-a cercetat, de asemenea, influenţa substanţelor curarizante asupra undei catalitice polarografice a cistinei, punîndu-se în evidenţă o anumită interacţiune cu gruparea tiol în funcţie atît de prezenţa atomului de azot cuaternar, cît şi de complexitatea moleculei (381).

În general, datele obţinute confirmă ipoteza relaţiei dintre gradul de lipofilie al moleculei şi intensitatea activităţii curarizante. Pe de altă parte,

paralelismul dintre activitatea curarizantă şi activitatea interfacială constituie un argument în favoarea ipotezei că substanţele curarizante acţionează la nivelul joncţiunii neuromusculare în funcţie de gradul lor de lipofilie.

2. CONTRIBUŢII LA CUNOAŞTEREA UNOR ASPECTE ALE METABOLISMULUI MUSCULAR

Cercetările noastre cu privire la metabolismul muscular, începute încă din 1961, se încadrează în contextul preocupărilor actuale în domeniul biochimiei musculare. În întreaga activitate desfăşurată s-a avut în vedere respectarea unor condiţii de lucru cît mai apropiate de acelea în care organismul animal funcţionează în mod normal (222). Totodată s-a constatat că unii cercetători folosesc excitaţia electrică în condiţii arbitrare, ceea ce face imposibilă compararea rezultatelor. Pentru a evita acest lucru, s-a elaborat un test — bazat pe evaluarea intensităţii exosmozei fosfaţilor din muşchi — care permite precizarea condiţiilor de aplicare a curentului electric. Acest test contribuie la stabilirea diferenţei dintre biochimismul muşchiului excitat în condiţii blînde şi biochimismul muşchiului alterat prin folosirea unor excitaţii prea puternice (242). Cu aceste precizări trecem la expunerea principalelor rezultate obţinute în următoarele direcţii :

1) metabolisml substanţelor macroergice din muşchi;
2) glicoliza musculară;
3) proteine sarcoplasmatice;
4) enzime glicolitice şi enzime participante la metabolismul macroergicelor din muşchi;
5) participarea unor anioni şi oligocationi la metabolismul muscular.

2.1. Metabolismul substanţelor macroergice din muşchi

Primele lucrări au fost consacrate proceselor biochimice care stau la baza fenomenelor de excitabilitate musculară, luîndu-se în consideraţie faptul că nu se cunoaşte fundamentul biochimic al acestei proprietăţi fiziologice a muşchiului. Analiza critică a unor lucrări din literatură care au promovat ideea că între creatinfosfat, substanţă macroergică de bază în biochimismul muscular, şi excitabilitate există unele relaţii a fost făcută atît din punct de vedere teoretic, cît şi experimental. Cercetările au fost efectuate în condiţii cît mai apropiate de acelea în care funcţionează muşchii unui organism viu. În acest fel s-a putut dovedi că descompunerea creatinfosfatului nu este condiţionată de efortul mecanic exercitat de muşchi şi că între nivelul creatinfosfatului şi gradul de excitabilitate al muşchiului nu există interdependenţă (222).

Totodată, asemenea date au constituit baza demonstraţiei teoretice că, în cazul creatinfosfatului muscular, coeficienţii izometrici nu pot fi aplicaţi, deoarece între descompunerea acestei substanţe macroergice şi efortul muscular nu există relaţii directe (221).

Constatările experimentale au fost confirmate şi de cercetările care au arătat că excitaţiile ca atare sînt cele care acţionează asupra nivelului

creatinfosfatului și fac ca acesta să scadă cu numărul și puterea excitațiilor, indiferent dacă cu această ocazie mușchiul execută efort sau nu (152).

S-a desprins concluzia evidentă că, în anumite împrejurări, eforturi diferite sînt însoțite de descompunerea aceloraşi cantități de creatinfosfat și că descompunerea acestuia și exercitarea efortului mecanic sînt două fenomene independente. Scăderea excitabilității mușchiului nu influențează schimbările nivelului creatinfosfatului muscular, determinate de excitații.

În aceeași ordine de idei, cercetările efectuate au scos la iveală faptul că nivelul creatinfosfatului din mușchi depinde de echilibrul diferitelor procese biochimice legate de starea funcțională a mușchilor. Astfel, modificările fiziologice de natură diferită, dar asemănătoare din punct de vedere funcțional (narcoză), duc la creșterea nivelului de creatinfosfat, ca și în cazurile de curarizare și denervare. Excitațiile nervoase duc, dimpotrivă, la scăderea nivelului creatinfosfatului, ca și excitațiile electrice. Excitațiile subliminare și de scurtă durată nu se repercutează asupra nivelului creatinfosfatului muscular (220), (320).

Într-o altă grupă de cercetări, după un studiu comparativ al unor metode de dozare a creatinfosfatului (257), s-a trecut la urmărirea refacerii nivelului creatinfosfatului din mușchi după stimulări electrice. Astfel s-a constatat că mușchii izolați, supuși stimulărilor electrice lungi (5 min) sau scurte (5—10s) și păstrați timp de 1 oră sau 4 ore în soluții fiziologice de diferite compoziții, nu au posibilitatea să refacă creatinfosfatul consumat în cursul contracțiilor musculare (258). De aici se poate deduce că biosinteza creatinfosfatului implică un proces mult mai complex decît s-a crezut și care considerăm că nu poate să fie lămurit prin cercetări efectuate pe mușchi izolați. La această concluzie s-a ajuns în cursul mai multor ani de lucru pe modelul experimental reprezentat de mușchiul izolat (362)—(369). De aceea s-au urmărit aceste aspecte pe mușchi perfuzați *in situ*, metodă care nu s-a utilizat pînă acum în cercetările de biochimie musculară.

În vederea utilizării modelului experimental al perfuziei mușchilor trenului posterior de broască, s-a stabilit ce repercusiuni pot avea anumite tratamente asupra nivelului creatinfosfatului din mușchi (259). Astfel menționăm că, după perfuzia mușchilor de broască timp de 1 oră cu diferite soluții fiziologice, nu se produc modificări ale nivelului creatinfosfatului în comparație cu cel din mușchii neperfuzați.

După stimularea electrică a mușchilor gastrocnemieni, urmată apoi de perfuzia acestora cu soluții fiziologice, refacerea nivelului creatinfosfatului are loc numai în cazul efectuării unor tetanizări de scurtă durată (maximum 15 s). Aceasta ne-a permis să presupunem că refacerea creatinfosfatului din mușchii supuși tetanizărilor scurte și perfuzați ar avea loc pe alte căi decît în cazul tetanizărilor de lungă durată, și anume pe seama energiei (ATP) rezultate din glicoliză. Dovezile experimentale care s-au adus în sprijinul acestei afirmații sînt :

— la mușchii perfuzați și stimulați durate scurte de timp, biosinteza creatinfosfatului are loc în condiții de anaerobioză ;

— perfuzia cu soluția Ringer-bicarbonat care conține un inhibitor al glicolizei (acid monoiodacetic) blochează sinteza creatinfosfatului, chiar și după tetanizări scurte (260).

În continuare, s-au urmărit repercusiunile perfuzării mușchilor cu 2,4-dinitrofenol asupra biochimismului muscular. Astfel s-a constat că perfuzia mușchilor la temperatura de +20°C cu o soluție Ringer-bicarbonat care conține 0,1 mM 2,4-dinitrofenol determină scăderea nivelului creatinfosfatului. Acest fenomen nu apare cînd perfuzia are loc la temperatura de +3°C. La acest nivel extrem de scăzut al creatinfosfatului, mușchiul este în stare să se contracte. Pe acest fond scăzut al creatinfosfatului, stimularea electrică singulară de scurtă durată (20—30 s) determină o scădere evidentă a ATP, concomitent cu o creștere a ADP și AMP (263), aducîndu-se astfel o nouă dovadă experimentală a scindării ATP în contracția musculară.

Studiul mecanismului de acțiune al 2,4-DNP asupra mușchilor striați va fi tratat în subcapitolul referitor la enzimele glicolitice.

Într-o altă serie de cercetări s-a urmărit metabolismul compușilor adenozinfosforici (ATP, ADP și AMP) din mușchii striați, normali și stimulați electric, cu și fără travaliu (280). S-a constatat că stimulările electrice de scurtă durată (30 s) nu modifică nivelul ATP, ADP și AMP. Păstrarea constantă a nivelului acizilor adenozinfosforici s-ar datora multiplelor căi de refacere a ATP, și anume din CP prin intermediul creatinkinazei și din ADP prin intermediul miokinazei pe cale glicolitică și prin fosforilare oxidativă. Descompunerea ATP, pusă în evidență după stimulările electrice de lungă durată fără travaliu și accentuarea acestei descompuneri după stimulări cu travaliu, s-ar putea explica prin epuizarea rezervelor de creatinfosfat și deci prin imposibilitatea refacerii ATP pe această cale imediată. Creșterea ADP și modificarea raportului ATP/ADP după stimulări de lungă durată pot fi atribuită acțiunii miokinazei, iar menținerea constantă a AMP și apariția IMP după stimulări de lungă durată, cu travaliu, denotă o activare a AMP-dezaminazei.

Faptul că ATP nu scade sub anumite limite nici după stimulări prelungite a dus la presupunerea existenței în mușchi a unor mecanisme biochimice care nu permit scăderea totală a ATP (527).

Cercetările efectuate asupra enzimelor care intervin în metabolismul acizilor adenozinfosforici au adus o serie de date noi. Astfel, în urma stimulărilor electrice s-a constatat o activare a 5′-AMP-dezaminazei, ceea ce ar explica menținerea destul de constantă a AMP din mușchi (281). Din variațiile mici ale activității ATP-azei constatate în urma stimulărilor electrice, se deduce că această enzimă, participantă în procesul contracției musculare, nu are rol de reglare (282).

Prin punerea în evidență a creșterii activității miokinazei în primele minute de contracție s-a adus o dovadă experimentală directă a participării ei în procesul contracției musculare.

Între activitatea miokinazei, ATP-azei și AMP-dezaminazei există interrelații. Variațiile activităților acestei enzime în timpul contracției musculare determină reglarea concentrațiilor de ATP, ADP și AMP din mușchi (283).

2.2. Glicoliza musculară

Deși procesele glicolitice din mușchi au fost studiate încă de multă vreme, cercetările din ultimul deceniu, datorită unor progrese în metodologie și unor tehnici de mare sensibilitate, au putut aduce noi date cu pri-

vire la participarea glicolizei ca proces principal energetic la metabolismul muscular de efort.

Într-o primă etapă a cercetărilor noastre s-a dovedit că, în urma contracțiilor izotonice, în mușchi are loc o acumulare bruscă a acizilor lactic și piruvic. Totuși, deși glicogenul muscular se găsește în exces, chiar în condiții de excitare electrică moderată, acumularea lor nu se face proporțional cu numărul contracțiilor efectuate, producîndu-se o micșorare a ratei de formare a acidului lactic (412).

Într-o altă etapă de cercetare s-a urmărit variația acidului lactic din mușchii tratați cu diverși inhibitori ai glicolizei și apoi excitați electric. În acest mod a fost posibil să se constate atît existența unor procese capabile să metabolizeze acidul lactic, producîndu-se scăderea concentrației sale mult sub nivelul fiziologic de repaus, cît și posibilitatea altor componente de a genera indirect acid lactic prin revenirea sa la nivelul de bază (413). Dealtfel ultima observație a fost confirmată ulterior prin cercetarea variației aminoacizilor liberi musculari în urma unor perioade scurte sau lungi de stimulare (415), (444).

O serie de rezultate au fost obținute și prin cercetarea glicolizei aerobe a omogenatelor de mușchi în prezența unor diverse substrate. Astfel, prin incubarea omogenatelor de mușchi excitați electric într-un mediu de reacție îmbogățit cu diverse principii active (ATP, NAD etc.) și în prezența unuia din substratele : glicogen, G—6—P, F—6—P, F—1, 6—P, s-au constatat următoatele fapte noi :

— rata de formare a acidului lactic depinde atît de timpul de excitare, cît și de substratul adăugat ;

— formarea acidului lactic nu decurge liniar cu durata de stimulare decît în prezența glicogenului ca substrat ;

— s-a pus în evidență existența unor procese de activare și de inhibare a sistemului glicolitic, diferite de acelea cunoscute în literatură.

Cercetarea proceselor glicolitice din mușchii perfuzați a demonstrat că efluxul acidului lactic în lichidul de perfuzie are valori constante. Stimularea electrică a mușchilor perfuzați determină creșterea nivelului acizilor lactic și piruvic din mușchi, fără să existe proporționalitate între această creștere și durata de stimulare.

După stimularea electrică a mușchilor perfuzați s-a constatat creșterea efluxului acidului lactic în lichidul de perfuzie. După perfuzia mușchilor cu acid monoiodacetic, urmată de stimulare, nivelul acidului lactic tinde spre zero. Aceste date vin în sprijinul afirmațiilor anterioare (vezi paragraful 2.1), dovedind că în timpul stimulărilor mai lungi de 15 s creșterea glicolizei nu poate să pună la dispoziția mușchiului energia necesară (ATP) pentru refacerea întregii cantități de creatinfosfat scindat.

2.3. Proteine sarcoplasmatice

Utilizarea schimbătorilor de ioni a permis o separare înaintată a proteinelor solubile musculare (sarcoplasmatice) (411), care sînt într-o proporție de 2/3 proteine cu activitate enzimatică. Un alt aspect cercetat l-a constituit gradul de eterogenitate al unor proteine. Totodată s-au obținut o serie de date privind spectrul de absorbție în ultraviolet al frac-

ţiunilor separate, semnalîndu-se o serie de maxime specifice la 220 mμ (416).

Prin separarea proteinelor pe schimbători de ioni au fost localizate şi apoi evidenţiate prin electroforeză pe gel de amidon şi poliacrilamidă următoarele enzime: creatinkinaza, miokinaza, ATP-aza şi 5'-AMP-dezaminaza (287). O separare optimă a proteinelor sarcoplasmatice s-a obţinut prin adaptarea electroforezei verticale pe strat subţire de poliacrilamidă (420), tehnică utilizată şi la determinarea efectului 1-fluoro-2,4-FDNB asupra proteinelor sarcoplasmatice (418), precum şi asupra proteinelor serice (252).

Au mai fost elaborate o serie de lucrări cu privire la stabilirea corelaţiilor dintre proteinele sarcoplasmatice, precum şi dintre unele izoenzime, şi tipul de muşchi (striat şi neted). S-a precizat astfel că, deşi muşchiul striat diferă de cel neted prin specificul lui funcţional, totuşi proteinele lor sarcoplasmatice prezintă un grad de eterogenitate apropiat, respectiv o asemănare de comportare (410). Pe de altă parte, s-a evidenţiat că proteinele sarcoplasmei muşchiului striat se caracterizează printr-un înalt grad de eterogenitate, punîndu-se în evidenţă peste 22 de tipuri de proteine neindividualizate. Unele dintre aceste tipuri au fost caracterizate prin diferite metode fizico-chimice şi biochimice, aducîndu-se astfel contribuţii noi la cunoaşterea proteinelor sarcoplasmatice (385). De asemenea au fost obţinute date referitoare la izoenzimele lactatdehidrogenazei din musculatura striată şi netedă, semnalîndu-se deosebiri esenţiale în repartiţia activităţii pe cele cinci tipuri de izoenzime, care au fost corelate cu particularităţile metabolice şi funcţionale ale celor două tipuri de muşchi (387).

2.4. Enzime glicolitice şi enzime participante la metabolismul macroergicelor din muşchi

O atenţie deosebită a fost acordată cercetărilor privind activitatea catalitică a unor enzime din muşchi. Dozarea activităţii enzimative s-a efectuat fie pe omogenate musculare, fie pe enzime purificate în laboratorul institutului nostru. Astfel, în urma cercetării aldolazei la muşchii excitaţi electric s-au pus în evidenţă modificări ale activităţii sale enzimatice chiar în primul minut de contracţie, ceea ce dovedeşte că aldolaza este o enzimă cu rol de reglare a sistemului glicolitic (413). De asemenea s-a constatat că prin modificarea raportului dintre cele două fosforilaze, *a* şi *b*, are loc unul dintre cele mai importante mecanisme de reglare a glicolizei. În adevăr, s-a observat că activitatea fosforilazei *a* creşte extrem de mult după 15 s de excitare, începe să scadă după 30 s şi ajunge între limitele de repaus după 1 min de excitare. După 3 min, dar mai ales după 5 min de excitare — şi aceasta este una din observaţiile noastre cele mai importante —, activitatea fosforilazei *a* scade sub nivelul de repaus. Acest fapt infirmă presupunerea, existentă în literatura de specialitate, că fosforilaza *b* ar fi o formă inactivă sau cu o activitate extrem de redusă, deoarece curba de formare a acidului lactic arată în aceste condiţii o activitate glicolitică crescută de cîteva zeci de ori faţă de nivelul de repaus. Aceste rezultate permit să se presupună că fosforilaza *a* este responsabilă de declanşarea unui ritm rapid, dar de o durată limitată, a glicolizei,

în timp ce fosforilaza *b* acționează atît în repaus, cît și în eforturile prelungite, menținînd un ritm mai lent, dar constant, al glicolizei (530).

Un alt aspect cercetat a fost acțiunea de inhibare a activității miokinazei și creatinkinazei într-un mediu glicolitic. Astfel gradul diferit de inhibare determinat de termenii finali ai glicolizei (acidul lactic și acidul piruvic) justifică presupunerea că gradul de anaerobioză poate constitui un mijloc de reglare a activității acestor enzime. Totodată s-a urmărit acțiunea unor inhibitori metabolici asupra activității enzimelor amintite. Astfel iodacetamida inhibă doar creatinkinaza, în timp ce FDNB inhibă total creatinkinaza, dar are numai un slab efect inhibitor asupra miokinazei (284). FDNB afectează de asemenea activitatea izoenzimei LDH—M_4, dar nu are acțiunea asupra izoenzimei LDH—H_4 (418).

Pentru a elucida la ce nivel metabolic ar acționa 2,4—dinitrofenolul, s-au cercetat două enzime cu rol esențial în desfășurarea proceselor glicolitice : fosforilazele *a* și *b* (264), care declanșează glicoliza, precum și o altă enzimă situată la sfîrșitul reacțiilor din acest lanț, lactatdehidrogenaza (419).

S-a constatat că perfuzia mușchilor cu o soluție Ringer-bicarbonat, conținînd 0,1 mM 2-4-dinitrofenol, produce o creștere cu 23% a nivelului de bază al activității lactatdehidrogenazei în comparație cu activitatea din mușchii perfuzați numai cu soluția Ringer-bicarbonat. Această creștere a activității lactatdehidrogenazei poate explica mărirea efluxului acidului lactic și, respectiv, a glicolizei musculare în cursul perfuziei mușchilor cu soluția Ringer-bicarbonat, care conține 2,4-dinitrofenol.

Creșterea de mică amploare a activității creatinkinazei și ușoara scădere a activității miokinazei, produsă de perfuzia mușchilor cu soluția de 2,4-dinitrofenol, nu par să fie cauzele responsabile de scăderea drastică a creatinfosfatului, produsă de această substanță (286).

Studierea caracteristicilor cinetice ale unor preparate enzimatice pure, obținute în laboratorul nostru, a dus la o serie de rezultate. Astfel s-a constatat că termenii finali ai glicolizei (acidul lactic și acidul piruvic) au un efect activator asupra fosforilazei *b*, în timp ce acidul citric nu influențează activitatea fosforilazei *b* purificate din mușchiul de broască. Faptul că inhibiția competitivă produsă de ATP asupra fosforilazei *b* nu este influențată de acizii lactic și piruvic, în timp ce acidul citric are un efect protector, este o dovadă a rolului jucat de citrat și a interrelațiilor dintre glicoliză și respirație (288).

Modificarea constantelor cinetice K_m și V_{max} în prezența 2,4-DNP ne-a dus la presupunerea că inhibiția produsă de 2,4-DNP asupra fosforilazei *b* provoacă modificări structurale ale enzimei. AMP, activatorul fosforilazei *b*, are un rol protector față de inhibiția produsă de 2,4-DNP (421).

Prin studierea comportării izoenzimelor M_4- și H_4-LDH în prezența unor fosfonucleotide (ATP, ADP, AMP, GTP, UTP și ITP) s-a constatat că acestea, cu excepția AMP, determină un anumit grad de inhibare a activității LDH—M_4 și —H_4, existînd diferențe de comportare cinetică atît față de substrat (piruvat), cît și față de coenzimă (NADH) (289).

S-a pus de asemenea în evidență o activare a LDH-tip mușchi produsă de 2,4— DNP, care în același timp are și un oarecare efect protector față de inhibiția determinată de lactat (422). De asemenea au fost

evidenţiate modificări caracteristice la nivelul izoenzimelor şi al activităţii lactatdehidrogenazei, malatdehidrogenazei şi aldolazei din muşchiul striat sub acţiunea tratamentului cu corticosteroizi şi în funcţie de natura acestora (74).

2.5. Participarea unor anioni şi oligocationi la metabolismul muscular

Printre componentele ţesutului muscular care îndeplinesc un rol important în metabolismul şi în activitatea funcţională a muşchiului, respectiv a celulei musculare, figurează în primul rînd anionul PO_4^{3-}, reprezentat prin fosfatul anorganic liber, şi cationii K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}.

Dată fiind importanţa fosfatului anorganic ca componentă a ATP şi CP, am urmărit în diferite stări funcţionale ale muşchiului variaţiile conţinutului în fosfat liber ca reflectare a nivelului substanţelor macroergice. Astfel s-a constatat că micşorarea excitabilităţii muşchiului prin curarizare determină o scădere a conţinutului în fosfat anorganic liber din muşchi, corespunzător creşterii nivelului creatinfosfatului, la a cărui sinteză ia parte. În schimb, contracţia musculară este însoţită de o creştere a conţinutului în fosfat liber ca urmare a scindării creatinfosfatului.

Constatarea că nivelul fosfatului anorganic liber din muşchiul curarizat şi apoi excitat este identic cu cel din muşchiul excitat în aceleaşi condiţii, dar necurarizat, vine să confirme concluzia noastră anterioară că scăderea excitabilităţii muşchiului nu determină o îngrădire a gradului de scindare a creatinfosfatului. De asemenea, conţinutul în fosfat liber din muşchiul în contracţie izotonică cu efectuare de travaliu nu diferă de cel din muşchiul în contracţie izotonică fără travaliu. Efectuarea travaliului nu determină o eliberare în plus de fosfat anorganic, confirmîndu-se şi de astă dată concluziile noastre din capitolul cu privire la substanţele macroergice. Totodată s-a pus în evidenţă un paralelism între conţinutul în fosfat anorganic din muşchi şi viteza exosmozei lui într-o soluţie Ringer (fără fosfat).

Rezultate asemănătoare s-au obţinut şi în alte stări funcţionale similare ale muşchiului. Astfel, în denervare, narcoză şi mişcare pasivă se constată, ca şi în curarizare, o scădere a conţinutului în fosfat anorganic liber, ca şi o scădere a exosmozei lui. În schimb, distrugerea măduvei spinării, ca şi excitarea electrică, se caracterizează printr-o creştere a conţinutului în fosfat liber din muşchi, respectiv prin creşterea exosmozei lui. Paralelismul dintre conţinutul în fosfat anorganic liber din muşchi şi viteza exosmozei lui pare a avea un caracter general (322), (319), (327), (350), (353).

În general, deplasările ionilor Na^+ şi K^+ între celula musculară şi spaţiul interstiţial sînt considerate ca fenomene de membrană. Totuşi, relativ recent s-a pus problema şi s-au adus chiar unele argumente în favoarea cuplării schimbului Na—K cu procesul contractil. Avînd în vedere că majoritatea cercetărilor privind schimburile ionice au fost făcute pe muşchi izolaţi şi în condiţii de excitare pînă la oboseală, am considerat că excitarea *in situ*, în condiţii experimentale mai fiziologice, ar putea să ne dea unele indicaţii în legătură cu participarea acestor cationi la procesul contractil, în condiţiile unor contracţii izotonice cu sau fără efectuare de travaliu.

Din datele obţinute pe muşchiul gastrocnemian de broască în contracţie cu travaliu, rezultă o deplasare a cantităţii de potasiu superioară celei din muşchiul în contracţie fără travaliu, ceea ce indică o participare a potasiului la procesul contractil (70).

Se ştie că întreruperea transmisiei impulsurilor nervoase determină, după un interval de cel puţin trei zile de la secţionarea nervului, diferite tulburări metabolice, puse în legătură cu atrofia muşchiului. Cercetările noastre, efectuate în condiţiile unei întreruperi de scurtă durată (denervare) de 24—48 de ore, deci înainte de apariţia atrofiei musculare, au pus în evidenţă modificări precoce în distribuţia şi concentraţia sodiului şi potasiului din muşchiul gastrocnemian de broască (71), (321).

În mod asemănător, blocarea transmisiei impulsurilor nervoase prin agenţi hipnotici şi anestezici (sarea de sodiu a acidului N-metil-ciclohexenil-barbituric) determină modificări precoce în concentraţia sodiului şi potasiului din muşchiul gastrocnemian de broască.

Urmărind influenţa K^+ şi a substituenţilor săi, Rb^+ şi Cs^+, s-a constatat că adaosul ionilor de K, Rb şi Cs mediului de imersiune produce scăderea cantităţii de apă totală şi a acizilor lactic şi piruvic din muşchi.

Permeabilitatea membranei musculare pentru acizii lactic şi piruvic este mult mărită de prezenţa ionilor de K^+ în concentraţie de 10, 20 şi, respectiv, 50 mM/l atît la muşchiul sartorius, cît şi la cel gastrocnemian de broască. Ionul de Rb^+ determină creşterea semnificativă a permeabilităţii muşchiului sartorius pentru difuzia acizilor lactic şi piruvic. La muşchiul gastrocnemian, Rb^+ determină creşterea permeabilităţii doar la concentraţia de 50 mM/l. Ionul de K^+ se comportă similar cu Rb^+ şi Cs^+, deci nu este specific.

Scăderea conţinutului în acid lactic şi piruvic sub influenţa K^+ şi a substituenţilor săi s-ar putea datora difuziei unor enzime glicolitice în mediul de imersiune sau inhibării unor enzime participante la procesul glicolitic (354)—(357).

Concepţia conform căreia compoziţia ionică are un important rol în controlul metabolic a primit numeroase confirmări experimentale. Dintre ionii cu acţiunea cea mai marcată din punct de vedere biologic se detaşează cei de sodiu, de potasiu, de calciu şi de magneziu. Totuşi, încă nu avem prea multe date concludente asupra mecanismului lor de acţiune şi deci asupra modului în care ei îşi manifestă acţiunea asupra glicolizei musculare.

Aceste ultime considerente ne-au determinat să întreprindem acest studiu, care dealtfel vine să completeze pe acelea în care s-au cercetat aspecte asupra rolului ionilor în celula musculară, pe de o parte, şi asupra proceselor de reglare a glicoliziei, pe de altă parte. Datele obţinute au arătat că cinetica proceselor de inhibare şi de activare a glicolizei produse de ionii Ca^{2+} şi K^+ în prezenţa ca substrat a fructozo-1,6-difosfatului nu este identică. Astfel, inhibarea determinată de ionul Ca^{2+} nu este proporţională cu timpul de incubare; în schimb, activarea produsă de ionul K^+ creşte proporţional cu durata incubării. Modul de acţiune al celor doi ioni este diferit, probabil datorită faptului că ei acţionează în mod prioritar la nivelul unor enzime diferite (423).

Cercetările din domeniul biochimiei musculare, efectuate în laboratorul nostru, au mai cuprins şi alte aspecte, ca, de exemplu, un studiu

asupra fosfolipidelor, care se găsesc în majoritatea lor în musculatura striată şi netedă. S-a dovedit astfel că fosfolipidele musculare, spre deosebire de lipidele totale, manifestă o constanţă a valorilor lor la ambele tipuri de muşchi (386). În diferite stări funcţionale se modifică atît conţinutul fosfolipidic total, cît şi spectrul cromatografic al fosfolipidelor musculare (72). De asemenea s-a urmărit exosmoza substanţelor reducătoare în diferite stări funcţionale ale muşchiului (351).

Prin faptul că compuşii imidazolici au un rol în metabolismul muscular, s-a efectuat separarea lor prin cromatografie în strat subţire de silicagel (417) etc.

Referatul de faţă cuprinde contribuţiile originale ale colectivului Laboratorului de biochimie animală, concretizate în numeroase lucrări ştiinţifice publicate în revistele de specialitate din ţară şi din străinătate. Totodată, o parte din materialul prezentat a format obiectul a cinci teze de doctorat.

Predat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 359–367 (1972)

CERCETĂRI ÎN DOMENIUL BIOCHIMIEI COMPARATE

MIHAIL ŞERBAN, D. COTARIU şi C. IORDACHE

Biochimia comparată reprezintă un domeniu de actualitate şi perspectivă în contextul ştiinţelor biologice (473), (475). Ea s-a impus cu autoritate nu numai ca concepţie, ci şi ca metodă de investigare (466), (477), fiind considerată ca una dintre cele mai actuale modalităţi de abordare a biologiei.

Progresele realizate în acest domeniu mai ales în ultimul deceniu au contribuit la conturarea pe baze moderne a două direcţii majore de cercetare, şi anume enzimologia comparată şi evoluţia moleculară, ca principale preocupări şi tendinţe. Orientarea cercetărilor de biochimie comparată în aceste direcţii şi interesul pe care ele îl polarizează sînt justificate de semnificaţia şi de implicaţiile lor în ansamblul ştiinţelor biologice în general şi al evoluţiei biochimice a lumii vii în particular (472), (473).

După cum este cunoscut, în unele ţări au fost create prestigioase şcoli în domeniul biochimiei comparate, şcoli ilustrate de personalităţi marcante ale biochimiei contemporane. În ţara noastră însă, cu excepţia cîtorva lucrări izolate, acest domeniu nu a fost anterior dezvoltat. Prin cercetările sistematice de biochimie comparată iniţiate şi efectuate de către nucleul format în cadrul Institutului de biochimie s-au pus bazele dezvoltării şi consolidării şi la noi a acestui important domeniu. Astfel cercetările de biochimie comparată a proteinelor şi mai ales a izoenzimelor, efectuate în laboratorul nostru, reprezintă o continuitate de-a lungul mai multor ani, reflectă o preocupare constantă şi se înscriu, prin modul de abordare şi nota de originalitate, în direcţiile actuale de cercetare menţionate. Totodată, prin rezultatele obţinute s-au adus şi o serie de contribuţii la conturarea unor noi capitole ale biochimiei comparate.

Evoluţia cercetărilor întreprinse de către noi este redată schematic în figura 1, din care se deduc cronologic două arii importante de preocupări, a căror axă o constituie problema filogeniei. Astfel, într-o etapă iniţială au fost studiate proteinele cerebrale solubile, ca şi proteinele musculare sarcoplasmatice, în seria vertebratelor. Rezultatele şi ideile formulate au condus implicit, într-o etapă următoare, la aprofundarea şi la extinderea acestor cercetări prin abordarea unor aspecte moderne de enzimologie comparată, respectiv biochimia comparată a izoenzimelor. În fine, în sfera preocupărilor noastre au intrat şi unele probleme din domeniul fosfolipidelor (72), (78), (80), (386).

Ideea pe care se fundează cercetările de biochimie comparată efectuate şi pe care, de fapt, aceste cercetări o ilustrează este aceea a evidenţierii şi stabilirii relaţiilor dintre însuşirile fizico-chimice şi biochimice

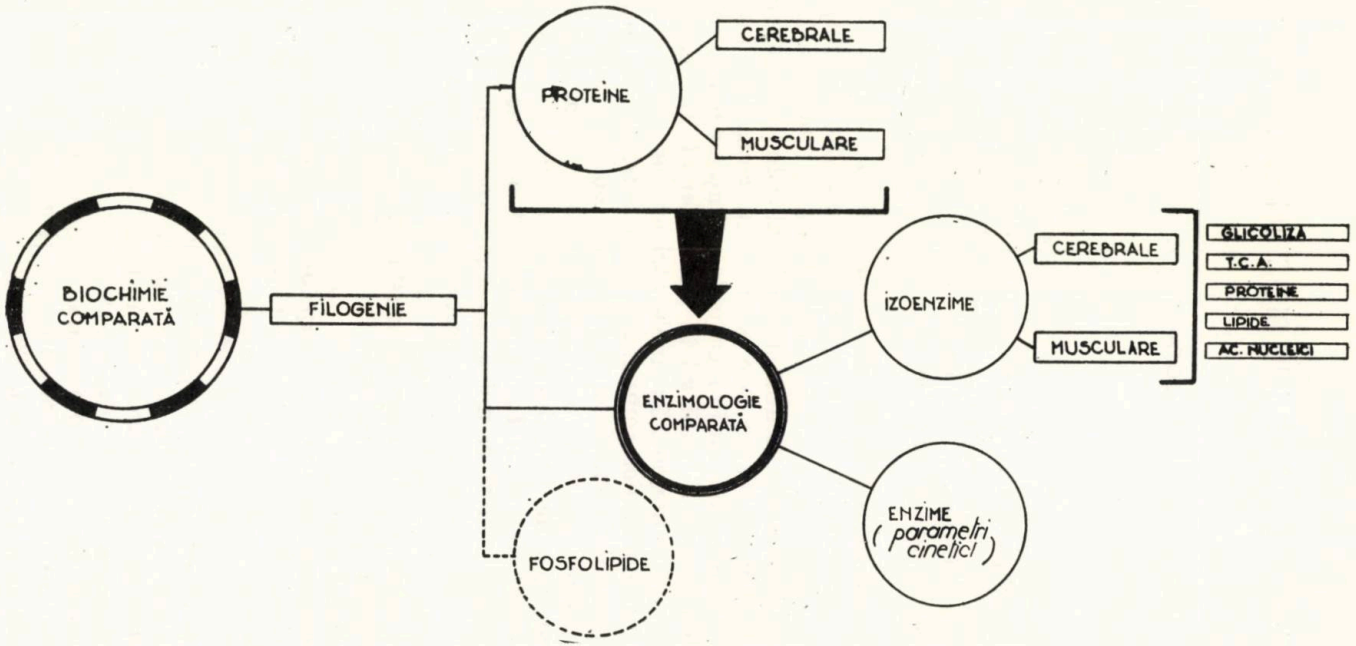


Fig. 1. — Evoluţia cercetărilor de biochimie comparată.

ale proteinelor, respectiv ale izoenzimelor, şi evoluţia filogenetică. Alegerea acestor componente ca substrat al cercetărilor de biochimie comparată este motivată prin faptul că moleculele protein-enzimelor constituie cea mai adecvată cale de studiere a procesului evolutiv la nivel biochimic. Mai mult, specificitatea biologică a organismelor reprezintă o expresie a specificităţii biochimice a anumitor proteine, în speţă a celor dotate cu activitate enzimatică (472), (473).

Totodată, scopul acestor cercetări este de a stabili trăsăturile biochimice generale şi particulare care caracterizează organisme situate pe diferite trepte de evoluţie, de a corela aceste trăsături cu relaţiile filetice dintre specii, precum şi de a contribui la fundamentarea concepţiei că evoluţia biologică implică şi o evoluţie biochimică, cu modificări şi respectiv adaptări în sistemul proteic al organismelor vii.

În contextul acestor cîteva date generale introductive, invocate pentru a delimita şi a preciza cadrul cercetărilor noastre, vom ilustra în continuare principalele aspecte şi concluzii ale acestor cercetări în ordinea abordării celor două direcţii menţionate.

1. BIOCHIMIA COMPARATĂ A PROTEINELOR CEREBRALE

În cadrul investigaţiilor întreprinse în această direcţie s-a urmărit caracterizarea acestor proteine, precizarea unor aspecte referitoare la natura şi la proprietăţile lor şi, pe baza datelor obţinute, stabilirea relaţiilor dintre proteinele cerebrale solubile şi gradul de evoluţie al creierului pe plan filogenetic (388), (396), (471), (529).

Astfel s-a demonstrat că proteinele cerebrale solubile se caracterizează printr-un grad înalt de eterogenitate, exprimat printr-un număr mare de tipuri de proteine componente. În funcţie de evoluţia filogenetică, proteinele cerebrale solubile prezintă o diferenţiere de natură calitativă, specifică, care se manifestă printr-o creştere a numărului de tipuri de proteine (379). S-a subliniat ca semnificativă existenţa unor fracţiuni de tip „prealbuminic", specifice proteinelor solubile din creierul vertebratelor mai evoluate filogenetic.

O altă caracteristică este aceea că în componenţa proteinelor cerebrale solubile se remarcă predominanţa tipurilor de natură globulinică, indiferent de gradul de evoluţie filogenetică. Sub raport cantitativ, fracţiunile corespunzătoare albuminelor apar în proporţie mai mică ($\sim$ 10%). De asemenea tipurile de proteine cerebrale, care prezintă din punct de vedere cantitativ valoarea cea mai ridicată, sînt localizate în regiunea electroforetică a betaglobulinelor, unde este, de fapt, şi zona de acumulare a lipoproteidelor. Cercetările efectuate au dovedit că proteinele cerebrale sînt componente complexe: glico- şi lipoproteice (380). S-a constatat că glicoproteidele cerebrale, neutre şi acide, manifestă un grad de eterogenitate diferit în filogenie; aceste componente sînt localizate pe toate tipurile de proteine cerebrale corespunzătoare fiecărei trepte de evoluţie. Dimpotrivă, lipoproteidele cerebrale sînt complexe mai omogene, manifestînd o comportare în cîmp electric în general identică pentru diferite trepte de evoluţie filogenetică.

Dar pe lîngă aspectele menţionate, care definesc diferenţierea proteinelor cerebrale în filogenie, s-au pus în evidenţă şi o serie de trăsături asemănătoare pe care le prezintă aceste proteine. S-a stabilit astfel faptul că diferitele tipuri de proteine cerebrale manifestă caractere de solubilitate salină apropiate, ceea ce reflectă într-un anumit grad configuraţia lor superficială (384). După proprietăţile lor de solubilitate, s-a conchis că majoritatea tipurilor de proteine cerebrale prezintă în filogenie o proporţie, respectiv o repartiţie destul de asemănătoare a grupărilor polare hidrofile. Pe baza criteriului solubilităţii saline, s-a semnalat că anumite tipuri de proteine din creier, denumite arbitrar „albumine" sau „globuline" prin analogie cu ordinul de mobilitate electroforetică al proteinelor serice, nu pot fi încadrate riguros în aceste categorii. Printre proteinele cerebrale solubile s-a pus în evidenţă existenţa a două tipuri caracterizate printr-o solubilitate salină mare, precum şi prin discordanţa dintre această solubilitate, care le conferă o anumită apartenenţă (tip albumine), şi sarcina lor electrică, care le conferă o altă apartenenţă (tip globuline).

Proteinele cerebrale solubile se fracţionează prin salifiere în patru fracţiuni principale, care se deosebesc prin compoziţia şi proprietăţile lor (384). Astfel, la concentraţii saline mici se fracţionează unele componente cu caracter glicolipoproteic, percum şi complexele lipoproteice; tipurile de proteine care determină prin numărul lor eterogenitatea proteinelor din creier în filogenie se fracţionează la concentraţii saline mai mari, posedînd deci solubilităţi saline mai mari. Aspectele menţionate se regăsesc pe întreaga scară filogenetică a creierului. Rezultă, aşadar, că aceste proteine manifestă în filogenie şi o trăsătură comună.

Investigaţiile noastre s-au adresat şi altor proprietăţi ale moleculelor proteice. Astfel, din punct de vedere polarografic, proteinele cerebrale solubile se caracterizează printr-o serie de indici, care, după valoarea lor, pot fi consideraţi drept constante în evoluţia filogenetică (382). S-a arătat că aceste proteine prezintă în filogenie o comportare similară, dovedită prin activitatea lor interfacială şi prin activitatea catalitică a grupărilor tiol ale proteinelor native, denaturate chimic sau hidrolizate enzimatic. Cercetările întreprinse în diferite variante experimentale au adus date noi cu privire la natura proteinelor cerebrale solubile, stabilindu-se şi pe această cale că în componenţa acestora, indiferent de gradul de evoluţie, intră cu predominanţă tipuri de proteine practic de aceeaşi natură, şi anume globuline, ceea ce a confirmat ipoteza noastră anterioară.

Pe baza cercetării corelaţiei dintre proteinele cerebrale şi aminoacizii liberi din creier în filogenie s-a stabilit că, independent de gradul de evoluţie, în compoziţia creierului se pune în evidenţă existenţa aminoacizilor cunoscuţi (383). S-a precizat că conţinutul creierului în aminoacizi prezintă în filogenie, calitativ şi cantitativ, o mare asemănare, ceea ce subliniază trăsătura comună, unitatea acestei compoziţii. Dar această unitate rezultă şi din existenţa unor compuşi semnificativi, şi anume acidul glutamic, acidul gammaaminobutiric, glutamina şi glutationul. Ultimul apare ca un component semnificativ din punct de vedere cantitativ, mai ales în creierul vertebratelor cu sînge rece. S-a mai pus în evidenţă existenţa aminoacizilor legaţi de RNA în cortexul cerebral uman şi al diferitelor mamifere (402) şi s-a postulat posibilitatea existenţei în diferite organe a unor clase variate de RNA pe baza unor legături cu aminoacizii

și, eventual, cu lipidele. Conținutul în aminoacizi din proteolipide (79) prezintă diferențe remarcabile în funcție de ariile anatomice ale creierului; pornind de la acest fapt, s-a emis ipoteza existenței unor legături directe între aminoacizi și fosfolipidele cerebrale.

Generalizînd datele obținute în cadrul acestor cercetări de biochimie comparată a proteinelor, s-a conturat ideea fundamentală că proteinele cerebrale solubile prezintă în filogenie o diversitate și, totodată, o unitate (388). Diversitatea se manifestă prin grade de eterogenitate diferite, precum și prin unele caracteristici în care se reflectă diferențierea calitativă a acestor proteine, corelată cu evoluția creierului pe plan filogenetic. Paralel cu aceasta, unitatea proteinelor cerebrale în filogenie se deduce din existența unor proprietăți comune, a unor asemănări de comportare fizicochimică. Dacă diversitatea proteinelor cerebrale este condiționată de activitatea funcțională, respectiv de structura morfologică a creierului ca expresie a evoluției filogenetice, în schimb unitatea lor este determinată de natura asemănătoare, de existența unei filiații, respectiv a unui fond comun de proteine, care a persistat de-a lungul evoluției și care se manifestă printr-un ansamblu de proprietăți similare. În investigarea comparativă a proceselor biochimice, evidențierea caracterelor de unitate în cadrul diferitelor stadii evolutive poate prezenta o semnificație deosebită pentru înțelegerea și explicarea manifestărilor funcționale complexe, ca rezultat al evoluției.

2. BIOCHIMIA COMPARATĂ A IZOENZIMELOR

Cercetările efectuate în această direcție sînt izvorîte din cele anterioare, de biochimie comparată a proteinelor cerebrale, și reprezintă o dezvoltare și o aprofundare a acestora pe alt plan; totodată, cercetările în domeniul izoenzimelor se înscriu într-o sferă de mare actualitate, rezultatele obținute aducînd contribuții la conturarea unui nou capitol al biochimiei comparate, și anume biochimia comparată a izoenzimelor.

Concepția și ideile pe care se bazează investigațiile întreprinse în biochimia comparată a izoenzimelor și pe care, de fapt, aceste cercetări le evidențiază pot fi schițate astfel:

a) formele moleculare multiple care catalizează același tip de reacție constituie un fenomen cu caracter practic ubicvitar, o trăsătură generală comună diferitelor trepte filetice, putînd fi corelate la scară evolutivă;

b) caracterizarea și „ordonarea" izoenzimelor din punct de vedere „istoric" se bazează pe postulatul că moleculele proteice omoloage, prezente în diferite clase de vertebrate, ar fi putut deriva dintr-un precursor ancestral comun și ar reflecta, în consecință, relații străvechi la nivel molecular; studiul comparativ al izoenzimelor oferă astfel posibilitatea stabilirii unor relații între specii care ocupă poziții taxonomice diferite, furnizînd totodată explicații biochimice în legătură cu diversitatea fenotipică;

c) la nivelul polimorfismului enzimatic, respectiv la nivelul diferitelor tipuri de izoenzime, s-au putut petrece anumite modificări structurale-configurationale, care ar fi permis dobîndirea unor noi caracteristici; se acreditează astfel ideea că cercetarea izoenzimelor poate contribui la

precizarea bazelor biochimice ale evoluţiei, la înţelegerea apariţiei şi a dezvoltării funcţiilor biochimice ale protein-enzimelor, putînd servi totodată ca bază pentru comparaţii taxonomice;

d) trăsăturile caracteristice ale polimorfismului enzimatic, respectiv însuşirile diferitelor tipuri de izoenzime, coroborate cu relaţiile filetice între specii, pot permite conturarea anumitor concluzii referitoare la evoluţia biochimică a lumii vii.

După cum rezultă din figura 1, cercetările de biochimie comparată a izoenzimelor au inclus în mod deliberat următoarele trei aspecte: investigaţii în evoluţia filogenetică, investigaţii pe două organe (creier şi muşchi) cu profil metabolic şi cu nivele de dezvoltare diferite şi, în fine, investigarea unor seturi de izoenzime aparţinînd la catene metabolice diferite (glicoliză, ciclul Krebs, lipide, proteine şi acizi nucleici); abordarea unor asemenea aspecte creează posibilitatea stabilirii unor corelaţii mai ample pe diverse planuri, cu evidenţierea trăsăturilor de continuitate şi de discontinuitate sub raport biochimic.

Rezultatele cercetărilor menţionate au pus în evidenţă în creierul unor specii diferite aparţinînd tuturor claselor de vertebrate forme moleculare multiple ale lactatdehidrogenazei (LDH), aldolazei (A), malatdehidrogenazei (MDH) citoplasmatice şi mitocondriale, izocitrat- şi glutamatdehidrogenazei, aspartataminotransferazei (AAT) citoplasmatice şi mitocondriale, esterazelor şi RN-azelor. Deşi polimorfismul izoenzimatic constituie o trăsătură comună în filogenie, totuşi izoenzimele respective manifestă o serie de particularităţi care se pot corela cu procesul evolutiv (396).

Astfel, izoenzimele LDH (389), (393) prezintă în seria vertebratelor grade de eterogenitate şi proprietăţi fizico-chimice diferite (s-a arătat, de exemplu, că mobilitatea electroforetică poate constitui un indice de caracterizare şi de diferenţiere a izoenzimelor cerebrale în seria vertebratelor), care ar putea fi atribuite însuşirilor deosebite ale tetramerilor, ca reflectare a unor schimbări structurale-conformaţionale survenite în cursul evoluţiei filogenetice. S-a descris de asemenea fenomenul deplasării activităţii enzimatice în spectrul electroforetic al izoenzimelor LDH din creier (393) în funcţie de evoluţie, fenomen care a fost corelat cu particularităţile funcţionale ale creierului ca expresie a însăşi evoluţiei sale (fig. 2). Deplasarea maximului de activitate de pe tipurile de izoenzime cu migrare lentă pe cele cu migrare rapidă constituie o caracteristică ce denotă nu numai schimbări evolutive şi adaptări ale sistemului proteic-enzimatic, ci şi modificări ale proceselor metabolice. Datele obţinute au sugerat posibilitatea unei tranziţii de la procese de tip aerob, mai puţin accentuate în creierul speciilor situate pe primele trepte de evoluţie a vertebratelor, spre procese de tip preponderent aerob, specifice creierului formelor celor mai evoluate, respectiv mamiferelor. Un argument în favoarea acestei afirmaţii a fost adus şi prin valorile activităţii enzimatice totale LDH, activitate care este cu 60—70% mai crescută în creierul vertebratelor inferioare, ceea ce sugerează că la aceste vertebrate procesele de tip anaerob sînt mai accentuate decît la vertebratele mai evoluate. Aceste date au fost completate şi coroborate cu cele furnizate de studiul MDH (395). S-a demonstrat astfel că activitatea acestei enzime prezintă o creştere de la vertebratele inferioare (peşti) spre vertebratele mai evo-

luate, sugerînd preponderența la acestea din urmă a proceselor de tip oxidativ; pe de altă parte, s-a evidențiat existența unui paralelism între activitățile LDH și MDH în filogenia creierului.

O serie de alte caracteristici distinctive au fost semnalate la nivelul MDH citoplasmatice și mitocondriale, caracteristici care se corelează cu procesul evolutiv. Mobilitatea electroforetică specifică, eterogenitatea diferită a formei citoplasmatice la diferite vertebrate, existența unor însușiri distinctive ale formei mitocondriale MDH la vertebratele superioare, variabilitatea conformațională, repartiția activității enzimatice pe cele

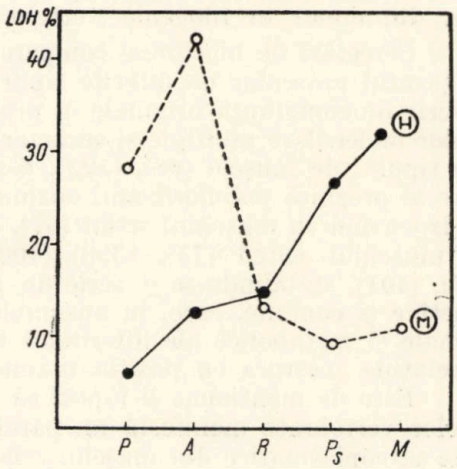


Fig. 2. — Deplasarea activității enzimatice în spectrul electroforetic al izoenzimelor lactatdehidrogenazei (tipul H și M) din creier în evoluția filogenetică. (*P* — pești; *A* — amfibii; *R* — reptile; *Ps* — păsări; *M* — mamifere).

două forme cu localizare diferită, ca și pe conformerii respectivi, comportarea diferențiată în raport cu anumiți inhibitori, precum și valorile activității enzimatice specifice diferitelor clase de vertebrate, constituie caracteristici care subliniază existența unor modificări petrecute la nivelul moleculei de enzimă ca reflectare a procesului de evoluție.

De asemenea s-a pus în evidență faptul că între polimorfismul și unele proprietăți ale AAT și MDH există o analogie pregnantă la creierul și la mușchiul aceleiași specii; totuși, izoenzimele AAT prezintă și o serie de deosebiri între specii aparținînd unor clase diferite de vertebrate (407). Unele particularități pe care le manifestă aceste izoenzime se referă, de pildă, la următoarele aspecte: ambele forme — citoplasmatică și mitocondrială — prezintă mobilități în cîmp electric caracteristice pentru speciile din clasele de vertebrate mai evoluate, spre deosebire de vertebratele inferioare (amfibii, pești), la care forma mitocondrială are în acest sens cu totul alte asemenea proprietăți; forma ciotplasmatică a AAT manifestă o eterogenitate epigenetică (conformeri) mai accentuată la vertebratele inferioare decît la cele superioare (mamifere, păsări); ambele tipuri de izoenzime AAT din creierul de mamifere indică mobilități electroforetice mai mari comparativ cu celelalte vertebrate, ceea ce prezintă analogie cu unele tipuri de izoenzime, LDH, MDH și A (389); paralelismele semnalate în comportarea izoenzimelor AAT și MDH se extind nu numai la specii aparținînd tuturor claselor de vertebrate, ci chiar în cadrul

aceleiaşi specii, la două organe cu profil metabolic diferit, cum sînt creierul şi muşchiul.

Un alt grup de cercetări au evidenţiat corelaţia dintre eterogenitatea şi activitatea A (73) din creier şi evoluţia acestui organ în seria vertebratelor, existenţa unor tipuri comune de izoenzime ale A în filogenie, precum şi o afinitate pentru substrat (fructozo-1,6-difosfat, fructozo-1-fosfat) caracteristică diferitelor trepte evolutive. Spre deosebire însă de creier, polimorfismul A în muşchii scheletici ai diferitelor vertebrate este mult mai mic şi practic similar la toate speciile investigate.

Menţionăm că o serie de alte cercetări s-au referit la izoenzimele izocitratdehidrogenazei (390), glutamatdehidrogenazei (390), esterazelor etc. din creier în filogenia vertebratelor.

Cercetări de biochimie comparată a izoenzimelor au fost extinse şi la ţesutul muscular de diferite tipuri, aducîndu-se şi în această direcţie o serie de contribuţii originale în problema relaţiilor dintre însuşirile formelor moleculare multiple şi caracteristicile funcţiei contractile, respectiv ale tipului de muşchi (68), (522). S-au descris astfel particularităţile pe care le prezintă polimorfismul enzimelor şi proprietăţile diverselor tipuri de izoenzime în muşchiul striat (67), (74), (387), (391), (394), (397), (398), în muşchiul neted (75), (399), (400), în muşchii albi şi în cei roşii (77), (401), stabilindu-se o serie de paralelisme, analogii, trăsături distinctive şi comune, care, în ansamblul lor, reflectă caracteristicile funcţionale şi metabolice ale diferitelor tipuri de ţesut muscular, precum şi corelaţiile acestora cu poziţia taxonomică a diferitelor specii.

Este de menţionat şi faptul că proteinele solubile din creierul diferitelor vertebrate manifestă un paralelism destul de marcant cu proteinele sarcoplasmatice din muşchii scheletici ai aceloraşi specii. O asemenea caracteristică se constată şi în cazul multor izoenzime. Acest paralelism sugerează că, la nivelul proteinelor solubile, diferenţele dintre specii par mai evidente decît diferenţele dintre cele două organe ale aceleiaşi specii. Transpusă pe un plan mai general, această remarcă reflectă relaţiile de unitate şi de diversitate intra- şi interspecifică în contextul evoluţiei biochimice (396), (397).

Alte cercetări au fost consacrate caracterizării enzimelor cerebrale şi musculare în filogenie prin studiul unor parametri cinetici (efectul concentraţiei substratului, efectul concentraţiei produsului de reacţie, pH-ul optim, denaturarea termică şi cu uree, efectul unor inhibitori etc.) (69), (76), (392). Analiza comparativă a datelor respective a relevat o serie de aspecte în legătură cu specificitatea de specie şi cea de organ, precum şi posibilitatea unor schimbări evolutive, reflectate în proprietăţile de ansamblu ale moleculei de enzimă, la diferite nivele evolutive. În acest context, o serie de contribuţii au fost aduse şi referitor la activitatea şi la repartiţia RN-azei pe diferite subfracţiuni celulare din muşchii scheletici în seria vertebratelor (155)-(157). S-a constatat astfel că, pe măsura evoluţiei, activitatea RN-azei creşte, iar pH-ul optim se deplasează spre domeniul alcalin. Activitatea enzimei este repartizată pe nuclee, mitocondrii şi lizozomi, cea mai intensă înregistrîndu-se pe mitocondrii şi pe lizozomi. S-a constatat de asemenea că activitatea enzimatică a fracţiunii lizozomale indică o serie de deosebiri, dintre care se remarcă creşterea acestei activităţi în raport cu evoluţia filogenetică.

Cercetările de biochimie comparată a izoenzimelor, integrate în diverse secvenţe metabolice, cu evidenţierea unor trăsături comune şi diferenţieri sugerează posibilitatea anumitor schimbări evolutive şi adaptări ale sistemului proteic enzimatic. Modificări intervenite la nivelul unor sisteme care biosintetizează diferite tipuri de izoenzime au putut fi selectate şi adaptate în cursul evoluţiei filogenetice. Caracteristicile semnalate la nivelul izoenzimelor reflectă totodată rolul posibil al unora dintre ele în procese de reglare şi de control, în dependenţă de necesităţile metabolice şi de poziţia taxonomică a diferitelor specii.

În fine, menţionăm că o serie de alte preocupări s-au referit la cîteva probleme teoretice ale biochimiei comparate, cum ar fi : interrelaţii între conceptele biochimiei comparate (isologie, analogie, omologie, convergenţă şi divergenţă biochimică, paralelism biochimic, filogenia proteinelor, evoluţia moleculară, „filogenia moleculară" etc. (472), (473), (475).

Unele din datele originale obţinute în cadrul cercetărilor efectuate în domeniul biochimiei comparate au fost incluse în două monografii (490), (491), dintre care una apărută. Ele au fost prezentate la diferite manifestări internaţionale sau sub forma de conferinţe în străinătate şi au făcut obiectul a două teze de doctorat (522), (529).

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 369–375 (1972)

CERCETĂRI DE IMUNOCHIMIE

V. GHEȚIE, CECILIA MOTAȘ, SILVIA MIHĂESCU, CORINA SARMANIOTI și DOINA ONICĂ

Cercetările Laboratorului de imunochimie s-au centrat pe un domeniu complet nou pentru majoritatea membrilor colectivului. Acest fapt i-a determinat să abordeze, printr-un efort comun, mai multe din domeniile de bază ale imunochimiei, pentru a-și putea stabili problemele în care să-și concentreze apoi activitatea.

Domeniile în care s-a lucrat sînt:

a) soarta antigenului introdus în organism;

b) răspunsul imun al acestuia;

c) structura subunităților moleculei de imunoglobulină G;

d) imunoglobulinele A;

e) relațiile structurale și funcționale dintre formațiile subcelulare.

Activitatea s-a concentrat în două direcții principale:

a) metabolismul imunoglobulinelor la nivel celular și subcelular;

b) localizarea zonelor de combinare în molecula anticorpului.

În continuare se vor prezenta realizările mai importante ale colectivului.

1. SOARTA ANTIGENULUI INTRODUS ÎN ORGANISM

Studiul soartei antigenului introdus în organism s-a inițiat prin întrebuințarea ca antigen a albuminei fluorescente, inoculată fie intravenos, fie intraperitoneal, fie prin perfuzie *in situ* a intestinului subțire (124), (130). S-a constatat că antigenul s-a concentrat nu numai în organele știute, ci și la nivelul intestinului subțire (129). Albumina este concentrată în mucoasa intestinală, la nivelul formațiilor subcelulare bogate în lizozomi din celulele endoteliale, și este modificată în produși finali similari cu acei ce rezultă prin scindarea ei cu enzime proteolitice (127), (130).

Aceiași produși finali s-au decelat și în fracțiunile bogate în lizozomi obținute din ficat și au apărut, *in vitro*, în prezența formațiilor subcelulare din splină (290).

În concluzie, s-a demonstrat că antigenul se concentrează și la nivelul intestinului subțire, hidroliza avînd loc în mucoasă și nu în sucul intestinal.

2. RĂSPUNSUL IMUN

Studierea capacității organismului de a răspunde la anumite antigene a relevat faptul că cobaii imunizați cu ser sanguin de iepure nu produc anticorpi față de gammaglobulină, ceea ce a determinat cercetarea răspunsului imun față de gammaglobulina pură (271). S-a constatat că răspunsuri imune bune dau doar animalele care au o persistență îndelungată a antigenului în circulație. Faptul a fost explicat ca datorit incapacității macrofagelor de a pinocita antigenul și nu asemănării structurale dintre gammaglobuline, cea antigen și aceea a iepurelui inoculat. În concluzie, cobaii prezintă un răspuns imun variabil față de gammaglobulina de iepure, ceea ce permite împărțirea lor în grupuri *responder* și *non-responder* în raport cu antigenul studiat (271). Mărirea capacității de răspuns imun față de antigene cu imunogenitate slabă sau aflate în cantitate mică s-a obținut prin hrănirea animalelor cu o dietă colesterolică (44). Studiindu-se anticorpii care se formează în timpul răspunsului imun primar, s-a constatat că acești anticorpi sînt sintetizați de aceleași tipuri de celule implicate și în sinteza imunoglobulinelor normale (61). Încercînd să se ateste participarea scoarței cerebrale în elaborarea anticorpilor, s-a arătat că la animalele atît în stare de inhibiție, cît și de excitație medicamentoasă inoculate cu antigen nu se realizează nici o modificare a titrului de anticorpi față de animalul-martor (302).

În ceea ce privește determinarea tipurilor de anticorpi care apar în timpul răspunsului imun, în Laboratorul de imunochimie s-a preconizat întrebuințarea metodelor de fluoroimunoelectroforeză și radioimunoelectroforeză (108), (105), iar pentru izolarea anticorpilor puri s-a propus întrebuințarea fie a cromatografiei de excludere moleculară (132), fie a imunosorbenților (270), (308).

3. STRUCTURA SUBUNITĂȚILOR MOLECULEI DE IMUNOGLOBULINĂ G(IgG)

Structura imunoglobulinelor și a subunităților lor componente a fost abordată mai ales din punctul de vedere al formelor lor molecular multiple. Eterogenitatea lor a fost cercetată atît electroforetic, cît și prin metoda focalizării izoelectrice. Au fost cercetate lanțurile L și H, precum și fragmentele Fab, Fc, Fc′ și Pep III′.

S-au determinat greutățile moleculare ale lanțurilor polipeptidice L și H din molecula de IgG de iepure prin cromatografie în strat subțire (81), iar prin focalizare izoelectrică s-a constatat că gradul de eterogenitate al lanțurilor L este mult mai mare decît îl indica analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă (138) sau în gel de agaroză care conține uree (267). Cu aceeași metodă a focalizării izoelectrice s-a studiat și comportarea fragmentelor Fab și Fc obținute din IgG de iepure, confirmîndu-se eterogenitatea avansată a fragmentului Fab și relativa omogenitate a fragmentului Fc (307). Scindarea cu papaină a IgG de iepure este dependentă

de pH-ul la care se lucrează; la pH acid s-a obţinut un fragment Fab încărcat mai pozitiv decît la pH neutru; cît priveşte fragmentul Fc, la pH acid s-au obţinut două tipuri; unul asemănător celui de la pH neutru şi unul cu o greutate moleculară mai mică (135). Hidroliza IgG de iepure la pH acid are ca rezultat desprinderea din regiunea Fc a fragmentului Fc′ în cazul întrebuinţării papainei şi a fragmentului Pep III′ în cazul pepsinei. S-a arătat că aceste fragmente diferă între ele prin cîţiva aminoacizi aşezaţi la capătul N-terminal, precum şi prin sarcina electrică, însă sînt identice din punctul de vedere al structurii antigenice (84). Modul de scindare al lanţului L s-a abordat prin hidroliza proteinelor Bence-Jones. Susceptibilitatea la hidroliză a două proteine Bence-Jones de acelaşi tip a fost diferită din punctul de vedere atît al cineticii de hidroliză, cît şi al calităţii fragmentelor eliberate (309).

Pentru studiul structurii anticorpilor şi a antigenului, ca şi al relaţiilor dintre ele, s-au mai preconizat două metode originale : combinarea imunodifuziei cu cromatografia în strat subţire (125) şi imunoelectrocromatografia în strat subţire (82).

În concluzie, s-a demonstrat că electrogenitatea moleculei de IgG rezidă în eterogenitatea unora dintre subunităţile care o alcătuiesc.

4. IMUNOGLOBULINELE A (Ig A)

Un capitol important al imunochimiei sînt anticorpii de tip A, care au o structură deosebită de a imunoglobulinelor G, formînd sistemul de apărare locală, şi care se găsesc în sînge şi, preponderent, în colostru şi salivă.

În decursul anilor, laboratorul nostru a abordat sporadic această problemă, pentru ca în ultimul timp să se concentreze asupra ei. Astfel s-au arătat raporturile antigenice dintre proteinele serice materne, imunoglobulinele colostrale şi proteinele serice ale noului născut la bovine (265), precum şi raporturile antigenice dintre serul sanguin, mucoasa intestinală şi sucul intestinal la şobolan (127). S-a demonstrat prezenţa IgA în colostru la bovine şi antigene specifice de tip IgA în mucoasa intestinală la şobolan. În serul cailor imunizaţi cu β-perfringens, activitatea biologică specifică de anticorp a fost concentrată în fracţiunea IgG (T), echivalentă cu IgA (62), iar din colostrul de cal s-a putut prepara o IgG(T) în stare de puritate avansată (330). Hidroliza cu papaină a IgA serice şi colostrale a demonstrat rezistenţa crescută a IgA colostrale la acţiunea enzimelor proteolitice, datorită stabilităţii conferite moleculei de Ig A de piesa secretoare (124). Stabilitatea a fost explicată prin interacţiunea piesei secretoare cu regiunea susceptibilă la atacul papainei (regiunea balama), determinînd „ascunderea" ei într-o arie inaccesibilă enzimei (124). Cu o reductază intracelulară s-a reuşit să se scindeze legăturile sulfhidrilice care leagă piesa secretoare de molecula de IgG dimere (147), (294), evidenţiindu-se participarea sistemului reductazic la disocierea moleculelor de imunoglobuline (133).

5. RELAȚII STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ÎNTRE FORMAȚIILE SUBCELULARE

În cadrul stabilirii interrelațiilor dintre formațiile subcelulare privite structural și funcțional, respectiv antigenic și enzimatic, s-a dovedit că compartimentele solubile ale mitocondriilor din creier și din ficat au o antigenicitate similară (377), fapt confirmat ulterior în literatură prin decelarea specificității de formație a enzimelor biloculare, componentele principale ale acestui compartiment (Y. Morino, J. Biol. Chem., **239**, PC 943 (1964). Prin întrebuințarea apei ca solvent de extracție a proteinelor solubile mitocondriale, la creier nu s-au putut identifica antigene specifice mitocondriale, evidențiindu-se o identitate antigenică între acestea și faza solubilă celulară (370). Prin determinarea activității enzimatice s-a constatat că enzimele localizate aici sînt în majoritate de tip citoplasmatic și nu mitocondrial (378), (372). În schimb, la ficat s-au putut evidenția prin același procedeu atît antigene specifice mitocondriale, cît și antigene comune cu citoplasma (371), confirmate prin activitatea enzimatică (378), (373).

Se sugerează corelarea formelor multiple ale transaminazei aspartice mitocondriale (conformerilor), cu prezența proteinazelor de tip alcalin din același preparat (291).

6. LOCALIZAREA ZONELOR DE COMBINARE ÎN MOLECULA ANTICORPULUI

Una dintre direcțiile principale ale cercetărilor din Laboratorul de imunochimie a fost localizarea zonelor de combinare în molecula anticorpului. Pentru aceasta s-a utilizat o tehnică originală de marcare diferențială cu ajutorul unor haptene și antigene fluorescente și radioactive (109), (342), (374). Inițial a fost nevoie să se studieze distribuția markerilor în molecula imunoglobulinelor, distribuție care poate indica eterogenitatea, simetria și configurația spațială fie a moleculelor intacte, fie a fragmentelor care conțin grupările implicate în activitatea imunologică. S-a arătat că o moleculă de IgG de iepure poate prinde două molecule de DANS, localizate inegal pe lanțurile polipeptidice (mult mai mult pe lanțul H decît pe lanțul L), iar fixarea are loc în porțiunea N-terminală (Fd) a lanțului H, implicată în formarea zonei de combinare a anticorpilor (266). Hidroliza cu papaină a gammaglobulinelor și a anticorpilor de iepure fluorocromați cu DANS decurge asemănător aceleia a anticorpilor nefluorescenți, fluorocromul fiind localizat doar pe fragmentul Fab (374). În continuare s-a demonstrat că molecula de DANS este prinsă de lanțul H în regiunea dintre locurile de atac ale pepsinei și papainei fie prin glucidele atașate în această regiune, fie direct de resturile ei de lizină (109), (268). Cît privește localizarea fluorocromului pe lanțul L, fixarea lui are loc în porțiunea N-terminală (83).

Între timp, după legarea haptenei DANS de albumină serică umană, s-a reușit să se obțină anticorpi anti-DANS, capabili să reacționeze cu haptena prinsă de orice alt suport proteic. S-a constatat că anticorpii

sînt prezenți atît în fracțiunile IgG_1, cît și în cele IgG_2 ale gammaglobulinei de iepure (41).

Prin studierea distribuției intramoleculare a substanțelor fluorescente, s-a ajuns în final la concluzia că molecula anticorpului nu este compactă, așa cum se figurează în modelele moleculare unanim admise, ci că există o regiune de cel mult 27 de resturi de aminoacizi în partea centrală a lanțului H, care prezintă un spațiu lacunar cu o dimensiune de aproximativ 39 Å; ea permite moleculei să ia configurații diferite în timpul combinării sale cu antigenul (131).

Cunoscîndu-se distribuția fluorocromului în molecula imunoglobulinei, următorul pas a fost să se studieze localizarea zonelor de combinare cu antigenul din molecula anticorpului. S-a arătat că, din cele două perechi de lanțuri polipeptidice care alcătuiesc molecula de anticorp, lanțul H, și anume capătul său N-terminal, are un rol principal în fixarea antigenului. El conferă moleculei anticorpilor specificitatea, în timp ce lanțul L are mai ales rolul de modelator al configurației zonei de combinare, determinînd tăria legăturilor (afinitatea) dintre anticorp și antigen (45), (458). La aceeași concluzie s-a ajuns în urma digestiei enzimatice a complexelor imune, deoarece s-a constatat că pe situsul de combinare se păstrează un fragment de antigen care este prins de capătul N-terminal al lanțului H și nu de lanțul L (123).

S-a dovedit că între lanțul L și capătul N-terminal al lanțului H (Fd) există o înrudire antigenică, care poate fi determinată de regiunea cu secvență constantă a celor două lanțuri (107). Aceste date au fost confirmate ulterior în literatură prin stabilirea secvenței complete a lanțurilor polipeptidice.

O parte din aceste rezultate a fost rezumată în actele celui de-al VII-lea Congres internațional de biochimie de la Tokio din 1967. Cercetările din această direcție s-au bucurat de un sprijin financiar al Organizației Mondiale a Sănătății în anii 1967—1968 și a făcut subiectul unei informări ținute în 1968 la Centrul internațional de referință pentru imunoglobuline din Lausanne.

7. PROCESELE BIOCHIMICE IMPLICATE ÎN CATABOLIZAREA IMUNOGLOBULINELOR LA NIVEL CELULAR ȘI SUBCELULAR

Am abordat această direcție deoarece este foarte puțin studiată comparativ cu reversul ei, sinteza moleculei de IgG. Se vor enumera concluziile care se desprind din rezultatele obținute.

Procesul catabolizării imunoglobulinelor la nivel celular are loc în două etape: captarea și digestia. În Laboratorul de imunochimie s-a arătat că, indiferent de sistemul celular, celulele nu sînt capabile să fixeze și să încorporeze cantități semnificative de IgG nativă pînă ce acestea nu au suferit o schimbare conformațională la nivelul regiunii Fc. Schimbarea de conformație poate fi indusă, *in vitro*, prin mai multe procedee, ca denaturarea termică, pH acid etc. (124), (126), (135), (299), (300). Denaturarea termică produce în serul sanguin uman un fenomen de omogenizare electroforetică, caracterizat prin apariția unei noi fracțiuni,

antigenic independentă atît de albuminele și de gammaglobulinele din care provine, cît și de α- și β-globuline, cărora li se suprapune ca mobilitate electroforetică (298)—(300). Denaturarea termică a IgG de iepure și scindarea ei cu tripsină au demonstrat prezența unui component cu o greutate moleculară și antigenicitate similară acelora ale IgG originale, însă cu o mobilitate electroforetică mult mai mare decît a acesteia din urmă (126).

Prin variația pH-ului spre zona acidă (între 2,0 și 3,8) și reîntoarcerea la pH neutru, IgG suferă o tranziție conformațională, care conduce la formarea de molecule reversibil sau ireversibil transconformate (111), (122). Investigarea diverșilor parametri, ca susceptibilitatea la papaină, capacitatea de a fi adsorbite de macrofage, variația sarcinii electrice sau gradul de agregare, a sugerat dependența de starea conformațională a proteinei a cantității de IgG încorporate în celule. S-a sugerat că schimbări conformaționale similare pot avea loc și *in vivo* și pot constitui prima etapă a catabolizării imunoglobulinelor. Viteza lor de catabolizare poate fi determinată de viteza de tranziție a moleculelor native în cele modificate (uzate) (122).

În ceea ce privește digestia celulară a imunoglobulinelor, în Laboratorul de imunochimie s-au întreprins numeroase studii asupra metabolizării moleculelor de IgG încorporate în celule, întrebuințînd sisteme celulare, fracții subcelulare bogate în lizozomi sau chiar enzime pure extrase din aceste celule. Studiile s-au făcut la nivelul organelor care fac sinteza anticorpilor (splina) (292) și care degradează anticorpii, dar nu-i pot sintetiza (ficat și intestin) (133), (128), precum și la nivelul celulelor implicate în prelucrarea chimică a complexelor antigen-anticorp (leucocite peritoneale) (145).

Moleculele de IgG modificate se fixează prin regiunea lor Fc de membrana celulară și sînt încorporate în pinozomul în curs de formare printr-un proces activ de adosrbție și de pinocitoză. O protein-disulfid-reductază, localizată pe membrana celulară, ar putea reduce o parte din moleculele de IgG, desfăcînd legăturile disulfidice interlanț (133,) (134). După fuzionarea pinolizomilor, catepsinele lizozomale de pH acid și catepsinele de pH neutru (129), (291) acționează asupra moleculelor de IgG sechestrate aici, eliberînd fragmente de tip Fab, Fc și Fc′. S-a dovedit că fragmentele de anticorpi de tip Fab (care poartă zonele de combinare) și Fc (care fixează complementul), care se obțin prin hidroliza anticorpilor cu papaină *in vitro* (135), sînt entități chimice cu un rol biologic bine definit în organism, ele rezultînd în celule în urma acțiunii catepsinelor lizozomale asupra imunoglobulinelor.

Fragmentul de tip Fc este scindat mai departe la un fragment de tip Fc′ de către catepsinele B (293) și D (269), (273), iar fragmentul de tip Fc′ este hidrolizat mai avansat, pînă la peptide, de către catepsina E (272). Fragmentele de tip Fab, cu legăturile disulfidice intacte, sînt rezistente la acțiunea catepsinelor. Conservarea fragmentului care poartă zona de combinare a anticorpilor permite ca aceștia să-și exercite în celulă rolul lor biologic, deși se găsesc sub o formă chimică modificată (145), (292). S-a arătat că prin desfacerea legăturilor disulfidice chimic sau enzimatic se induce o susceptibilitate la atacul catepsinelor, cu apariția de peptide și de fragmente moleculare mici (134).

Datele prezentate mai sus nu confirmă teoria lui Brambell (Nature, **203**, 1352 (1964)), după care moleculele fixate de receptorii celulari sînt protejate faţă de hidroliză şi se reîntorc intacte în circulaţie. Rezultatele obţinute au putut fundamenta o nouă teorie asupra catabolizării imunoglobulinelor la nivel celular (110). Catabolizarea imunoglobulinelor autologe se face diferenţiat, în raport cu „vîrsta" moleculelor; sînt încorporate în celule numai moleculele care suferă o tranziţie conformaţională, în urma uzurii metabolice la nivelul regiunii Fc. Sîngele conţine deci o populaţie eterogenă de imunoglobuline de diferite vîrste, adică în diferite stadii de alterare a structurii native. Aceste proteine modificate se fixează pe receptorii de pe suprafaţa celulei şi sînt încorporate în tractul digestiv intracelular. După încorporare, moleculele sînt distruse de sistemul cateptic, în cooperare, probabil, cu reductazele membranelor plasmatice, pînă la nivelul unor fragmente, peptide şi aminoacizi (130), (145), (292).

Rezultatele permit să se presupună că preparatele de anticorpi obţinute prin eluţia acidă de pe imunosorbent şi cele obţinute prin precipitare la rece cu alcool (46) vor avea o conformaţie modificată şi de aceea vor fi mai uşor încorporate şi distruse în sistemul reticuloendotelial, ceea ce va micşora considerabil efectul lor biologic.

S-a mai realizat un model experimental care permite determinarea numărului de molecule de anticorpi captate de către o singură celulă şi studierea mecanismului fizico-chimic de încorporare şi degradare a anticorpilor la nivelul formaţiilor subcelulare (145). S-a arătat că degrdarea este însoţită de legarea fragmentelor de moleculă de un acid nucleic; nucleoproteina este capabilă să transfere capacitatea de sinteză a anticorpilor unor celule de splină care provin de la animale neimunizate, cu condiţia de a se menţine integritatea fizico-chimică a complexului acid nucleic-proteină (361).

Cercetările din această direcţie au fost comunicate la cea de-a VIII-a întîlnire a Societăţilor europene de biochimie (FEBS), care a avut loc la Praga în 1968, rezumate în actele celei de-a IX-a întîlniri FEBS de la Madrid din 1969 şi au făcut obiectul discuţiilor secţiei de catabolizare a imunoglobulinelor de la I-ul Congres internaţional de imunologie de la Washington din 1971.

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 377–389 (1972)

BIOSTRUCTURA, O NOUĂ CONCEPȚIE DESPRE ALCĂTUIREA MATERIEI VII ȘI CERCETĂRILE DIN ACEST DOMENIU

Acad. E. MACOVSCHI, VIORICA ELEFTERESCU, IRINA CORNOIU, CONSTANȚA MUȘOLAN și OFELIA GOZIA

Concepţia biostructurală despre natura şi structura materiei vii s-a născut din necesitatea de a cunoaşte mai bine decît pînă acum această materie şi de a afla prin ce anume protoplasma vie se deosebeşte de protoplasma moartă.

În adevăr, concepţia moleculară, care domină biologia contemporană, nu dă suficiente precizări în această privinţă. Ea se limitează la stabilirea unor *criterii de caracterizare a materiei vii* şi nu arată concret în ce constă deosebirea între materia vie şi materia nevie. De exemplu, după *J. Bernal*, „*caracteristica* esenţială a oricărui organism atîta timp cît este viu constă în succesiunea şi coordonarea proceselor şi nu în arhitectura, oricare ar fi ea, a substanţei inerte", iar după *A. I. Oparin* „ceea ce este specific (deci *caracteristic*) pentru organizarea protoplasmei în timp şi pentru schimbul biologic de substanţe este coordonarea riguroasă, îmbinarea armonioasă a reacţiilor chimice, care nu se succedă întîmplător, ci se desfăşoară într-o ordine foarte precisă, guvernată de legi, formînd lanţuri simple şi ramificate, precum şi cicluri închise de transformări chimice... ca la reţeaua de reacţii ce se desfăşoară în sisteme deschise".

Or, trebuie făcută o distincţie netă între *viaţă*, *care este un proces*, bazat mai ales pe reacţii chimice coordonate (metabolism), şi *viul* (*materia vie*, *protoplasma vie*), *care este un sistem*, în cadrul căruia este posibilă desfăşurarea procesului vieţii. Subliniem că în viu desfăşurarea acestui proces *este posibilă*, *dar nu şi obligatorie*. Dovada: în materia celulelor, a ţesuturilor, a organelor şi chiar a organismelor vii aduse în stare de refrigerare, procesul vieţii nu are loc. Cum însă procesul acesta începe să se manifeste din nou de îndată ce materialul biologic refrigerat se readuce la condiţii normale de temperatură, înseamnă că în stare de refrigerare materia fiinţelor vii rămîne vie, chiar dacă fenomenele vieţii nu se produc în ea. Aceasta iese şi mai bine în evidenţă dacă se ia în considerare cazul cînd înainte de refrigerare sau în cursul ei materialul biologic a fost omorît. După readucere la condiţii normale a unui asemenea material, fenomenele vieţii nu mai apar. Înseamnă că materia vie aflată în stare de refrigerare se deosebeşte profund de materia moartă aflată în aceeaşi stare: prima îşi păstrează capacitatea de a manifesta procesul vieţii, pe cînd la cealaltă această capacitate lipseşte. Deci nu procesul vieţii este acela care deosebeşte materia vie de materia moartă, ci acel „ceva" care permite desfăşurarea

procesului menţionat atunci cînd materia vie se află în condiţiile normale de existenţă. Prin urmare, procesul vieţii bazat pe metabolism nu poate servi nici la definirea materiei vii şi nici la explicarea deosebirii dintre materia vie şi materia moartă; el poate constitui numai un criteriu de caracterizare a materiei vii, dar şi acesta numai în anumite împrejurări.

Consideraţiile de mai sus duc la întrebarea: în ce constă efectiv acel „ceva" prin care materia vie se deosebeşte de materia moartă?

Concepţia moleculară despre natura şi structura materiei vii nu dă un răspuns la această întrebare. De aceea a devenit necesară elaborarea unei alte concepţii, capabilă să aducă lumină în acest domeniu (194).

Premisele noii concepţii, „concepţia biostructurală", au fost conturate în cursul anilor 1958—1959 (172). După ele, o parte din materia protoplasmei vii este integrată într-o structură cu totul specială, caracteristică numai viului, numită *biostructură*, pe cînd cealaltă parte a materiei protoplasmei vii se prezintă ca o *soluţie intracelulară*.

Biostructura nu este o structură chimică sau fizico-chimică, ci o structură biologică care se află în continuă evoluţie şi a cărei stare depinde şi variază în funcţie de condiţiile mediului intern şi extern. Biostructura este purtătoarea însuşirilor specifice viului, există numai în protoplasma vie şi se destramă odată cu moartea acesteia, punînd în libertate componentele din care este alcătuită. Prin toate acestea, biostructura se deosebeşte principial şi calitativ de orice structură moleculară, polimoleculară şi supramoleculară pe care o poate forma materia nevie. Integrarea moleculelor diferitelor substanţe în biostructură necesită un aport de energie, datorită căruia moleculele respective, devenind componente ale biostructurii, îşi pierd ceea ce le este specific şi încetează de a se mai comporta ca molecule. Astfel, biostructura, „continuă" prin esenţa ei, nu are alcătuirea moleculară caracteristică materiei nevii, deşi componentele ei redevin molecule de îndată ce se desprind din ea. Tot din aceleaşi motive, forţele care leagă componentele biostructurii între ele, „biovalenţe", precum şi legăturile corelative care se stabilesc între aceste componente, „biolegături", se deosebesc prin specificul lor de toate categoriile de valenţe şi de legături care se manifestă între moleculele materiei nevii. Odată cu moartea protoplasmei, biovalenţele îşi încetează acţiunea, biolegăturile se desfac, componentele biostructurii se pun în libertate, redevenind molecule, şi astfel biostructura se destramă, materia biostructurată transformîndu-se în materia nevie obişnuită.

Soluţia intracelulară constă din apă şi din diferite substanţe hidrosolubile dizolvate în ea. Ca orice soluţie, ea are o alcătuire moleculară şi, prin urmare, reprezintă „materia nevie cuprinsă în viu"; totuşi, prin natura substanţelor pe care le conţine, ea se deosebeşte profund, dar nu şi calitativ, de materia nevie aflată în afara protoplasmei. Datorită conţinutului de substrate, enzime şi numeroase alte substanţe, soluţia intracelulară este sediul unor numeroase reacţii biochimice, dintre care unele furnizează energia necesară menţinerii integrităţii biostructurii.

Biostructura poate exista numai în cadrul unităţii indisolubile cu soluţia intracelulară, de la care primeşte nu numai energia necesară menţinerii integrităţii sale, ci şi acele substanţe ale căror molecule prin integrare în materia biostructurată devin componentele sale; la rîndul ei, soluţia intracelulară poate exista în natură numai alături de biostructură,

care contribuie atît la asigurarea compoziţiei sale chimice specifice, cît şi la coordonarea reacţiilor biochimice care se produc în ea. Rezultă că protoplasma vie, constituită din materia biostructurată şi materia nevie intracelulară, aflate în relaţii de coexistenţă obligatorie, se deosebeşte fundamental şi calitativ de protoplasma moartă, în care biostructura nu mai există. Rezultă de asemenea că materia biostructurată este acel „ceva" prin care materia vie se deosebeşte de materia nevie (176), (486).

Îndată după elaborarea concepţiei biostructurale s-a pus problema verificării valabilităţii ei. În acest scop s-a luat ca exemplu cazul concepţiei atomice-moleculare. Istoria ştiinţei arată că valabilitatea concepţiei atomice-moleculare a fost testată întîi teoretic, prin verificarea aplicabilităţii ei în diferitele domenii ale fizicii şi chimiei, iar apoi, pe măsura dezvoltării atît a concepţiei, cît şi a metodelor de cercetare, s-a trecut la testarea ei pe calea cercetărilor experimentale (189).

1. TESTAREA TEORETICĂ A CONCEPŢIEI BIOSTRUCTURALE

Testarea teoretică se bazează pe faptul cunoscut că o concepţie justă îşi găseşte aplicaţii în cele mai diferite domenii ale ştiinţei respective, generînd ipoteze şi teorii noi, specifice fiecărui domeniu abordat. Cu cît aceste domenii sînt mai multe şi mai variate, cu atît probabilitatea valabilităţii ipotezei respective este mai mare.

Pentru a stabili dacă concepţia biostructurală poate genera ipoteze şi teorii în diferitele domenii ale biologiei, s-a încercat aplicabilitatea ei în cadrul problemelor privind permeabilitatea celulară, mecanismul memoriei, relaţiile dintre medicamente şi enzime, relaţiile dintre noxe şi medicamente, mecanismul de acţiune a hormonilor, apariţia formaţiilor intracelulare, provenienţa undelor electroencefalografice, geneza materiei vii pe Pămînt şi fenomenul alergic. S-a constatat că în toate aceste cazuri concepţia biostructurală a generat teorii şi ipoteze noi.

Astfel a apărut *teoria biostructurală a permeabilităţii celulare*, care explică repartiţia asimetrică a electroliţilor între celulele vii şi lichidul interstiţial prin includerea majorităţii potasiului celular în biostructură şi rămînerea majorităţii sodiului celular în apa liberă a protoplasmei şi nu prin activitatea unei ipotetice „pompe de sodiu", cum se admite azi în cadrul teoriei membranei. Se arată de asemenea că energia provenită din metabolism menţine integritatea biostructurii şi astfel asigură repartiţia asimetrică a electroliţilor, spre deosebire de teoria membranei, după care o bună parte a energiei metabolice se consumă pentru menţinerea activităţii pompei de sodiu. Prin aceasta însă nu se neagă în principiu posibilitatea existenţei transportului activ. De asemenea teoria biostructurii prevede că în celulele vii apa se află în trei forme diferite : apă liberă, apă asimilată (adică cuprinsă în biostructură) si apă legată, pe cînd în celulele moarte, datorită destrămării biostructurii şi eliberării apei cuprinse în ea, apa se află numai în două forme : apă liberă şi apă legată. Rezultă că moartea celulelor este însoţită de modificarea esenţială a raporturilor dintre diferitele forme ale apei celulare, fenomen care nu era cunoscut pînă acum (179), (486).

Premisele unei teorii biostructurale a memoriei duc la concluzia că fosfolipidele integrate în biostructură pot alcătui aşa-zisele „formaţii polifosfolipidice", capabile să înmagazineze o cantitate enormă de informaţie senzorială, care depăşeşte cu mult cantitatea informaţiei ereditare care se acumulează în moleculele acizilor dezoxiribonucleici. Mai mult, aceste formaţii polifosfolipidice, împreună cu proteinele şi cu acizii nucleici, alcătuiesc matriţele pe care se înregistrează şi se păstrează informaţia senzorială şi în care fiecărei componente îi revine un rol mnezic bine definit. Prin conexarea acestei concepţii cu principiile tehnicilor de recepţionare, înregistrare şi reproducere a sunetelor, s-a ajuns, pe baza principiilor cibernetice, la intuirea mecanismelor de recepţionare a stimulilor şi a mecanismelor de înregistrare şi de reproducere a urmelor experienţei trecute. De asemenea s-au putut preciza natura şi modul de funcţionare a dispozitivelor neuroînregistrator, neuropurtător şi neuroreproducător, localizate în celulele nervoase care intervin în actele memoriei. Tot teoria biostructurală a memoriei permite explicarea mecanismelor diferitelor stări şi fenomene psihice, cum sînt stările de hipo- şi hiperestezie, apariţia amintirilor, manifestarea iluziilor şi a halucinaţiilor, precum şi precizarea diferitelor categorii de amnezii (181), (183).

Ipoteza biostructurală a raporturilor dintre medicamente şi enzime scoate la iveală o serie de interacţiuni noi dintre medicamente şi enzime, care nu pot fi nici prevăzute şi nici înţelese de pe poziţiile concepţiei moleculare. De exemplu, un medicament poate avea însuşirea de a acţiona direct asupra moleculelor unei enzime, provocînd activarea, inhibarea sau chiar blocarea activităţii lor catalitice. Dar acelaşi medicament poate fi cu totul inactiv asupra aceleiaşi enzime atunci cînd aceasta face parte integrantă din biostructură. Într-un asemenea caz, medicamentul influenţează în mod corespunzător activitatea enzimei numai *in vitro*, pe cînd *in vivo* rămîne fără efect asupra enzimei respective (182), (486). Înseamnă că rezultatele cercetărilor experimentale cu privire la acţiunea medicamentelor asupra enzimelor, efectuate *in vitro*, nu pot fi nicidecum generalizate şi considerate ca valabile fără rezerve în condiţiile unui organism viu.

Un aspect al ipotezei priveşte procesul evolutiv continuu prin care trece biostructura unui organism în decursul vieţii acestuia. În aceste împrejurări se înţelege că răspunsul unei anumite componente enzimatice din materia biostructurată faţă de acţiunea unui medicament şi, prin urmare, comportarea bolnavului faţă de medicamentul respectiv pot varia în funcţie de vîrsta bolnavului, specificul său ereditar, starea sa patologică, precum şi în funcţie de alţi parametri, asupra cărora nu putem insista aici.

Interacţiunile dintre moleculele enzimei, devenite prin asimilaţie componente ale biostructurii, şi celelalte componente ale materiei biostructurate nu rămîn fixe, ci evoluează după asimilaţie (178). Procesul este complicat şi se poate desfăşura în funcţie de factorii capabili să-i influenţeze, provocînd modificări ale stării componentelor materiei biostructurate, inclusiv a componentelor enzimatice. Aceasta înseamnă că activitatea catalitică a acestor din urmă componente nu rămîne mereu aceeaşi, ci se modifică în funcţie de starea şi de modul de evoluţie a biostructurii în care s-au integrat enzimele respective.

Al treilea aspect al ipotezei priveşte comportarea biostructurii faţă de acţiunea diferiţilor agenţi externi şi interni, deci şi faţă de medicamente.

Din moment ce admitem că, datorită legăturilor corelative care se stabilesc între componentele biostructurii, materia biostructurată reprezintă o formaţie continuă, „unitară", înseamnă că modificările provocate de agenţii externi şi interni în starea unora dintre componentele biostructurii se transmit altor componente şi se repercutează asupra întregii structuri. Astfel, un medicament, chiar inactiv asupra enzimelor cuprinse în biostructură, poate provoca modificări esenţiale ale activităţii lor catalitice, acţionînd asupra uneia sau alteia dintre componentele neenzimatice ale materiei biostructurate. Asemenea acţiuni provocate de cantităţi minimale ale medicamentului pot explica efectele, cîteodată extrem de puternice, ale medicamentelor administrate în doze infinitezimale, ca de exemplu, în homeopatie.

Tot în acest cadru poate fi examinată şi problema activităţii medicamentelor în condiţiile unui organism aflat sub acţiunea unor agenţi capabili să modifice comportarea materiei lui biostructurate, cum sînt stările anormale ale sistemului nervos, agenţii patogeni, substanţele excitante etc. În aceste condiţii, unul şi acelaşi medicament, administrat în acelaşi mod şi în aceeaşi doză, poate avea efecte diferite în funcţie de starea în care se află materia biostructurată a organismului respectiv. Aici se încadrează explicaţiile care se pot da stărilor alergice, influenţei stărilor psihice asupra comportării bolnavilor faţă de medicamente, efectelor tratamentului prin şoc, prin acupunctură etc.

Al patrulea aspect al ipotezei priveşte cazul medicamentelor care se pot integra în biostructura însăşi, devenind componente „anormale" ale acesteia. Odată integrate, medicamentele respective pot exercita în materia biostructurată anumite funcţiuni biologice, participînd la procesele elementare ale vieţii care se desfăşoară în biostructură. Cum însă astfel de componente „medicamentoase" se deosebesc de componentele „normale" ale materiei biostructurate, prezenţa lor în biostructură nu poate rămîne fără urmări asupra desfăşurării atît a metabolismului, cît şi a biochimismului din organismul respectiv. În asemenea împrejurări, acţiunea medicamentului devenit component al biostructurii poate fi de lungă durată, pînă la dezasimilaţia componentelor „medicamentoase", adică pînă la eliminarea lor din structura menţionată (182), (486).

Prin *ipoteza biostructurală a interrelaţiilor dintre noxe şi medicamente*, relaţiile complexe dintre noxe şi medicamente capătă un anumit sens datorită intervenţiei mecanismelor de reglare cuprinse în materia biostructurată. Fără a intra în detaliile ipotezei, menţionăm că ea permite lămurirea raporturilor dintre terapia alopatică şi terapia homeopatică, arată că principiile fundamentale ale celor două terapii au o bază teoretică comună, stabileşte modul de definire a dozelor „mari" şi „mici" ale medicamentelor în funcţie de starea materiei biostructurate la bolnavi şi deschide perspectiva unor noi cercetări experimentale în acest domeniu. Desigur, găsirea unor posibilităţi de caracterizare obiectivă a stării materiei biostructurate prin măsurarea parametrilor ei ar permite stabilirea exactă a condiţiilor în care lucrează noxele şi, prin aceasta, a condiţiilor de alegere, dozare şi administrare a medicamentelor (184), (486).

Ipoteza complecşilor asimilaţi completează o cunoscută ipoteză a „receptorilor hormonali" şi are ca scop explicarea multilateralităţii acţiunii hormonilor în organism. Admiţînd posibilitatea integrării în materia biostructurată a complecşilor formaţi între hormoni şi receptorii lor specifici, se rezolvă paradoxul îmbinării specificităţii structurale a hormonilor cu multilateralitatea acţiunii lor. În adevăr, conform celor două ipoteze, „specificitatea structurală" şi „multilateralitatea acţiunii" depind de două substanţe diferite: hormonul, respectiv complexul, şi nu de o singură substanţă, hormonul, cum se considera înainte (185), (486).

Ipoteza provenienţei biostructurale a formaţiilor intracelulare se bazează pe faptul cunoscut că formaţiile intracelulare se formează în celulele vii, care conţin materia biostructurată, şi nu în celulele moarte, în care materia biostructurată nu există. Conform acestei ipoteze, materia biostructurată contribuie la geneza formaţiilor intracelulare (190), (486).

La baza *ipotezei provenienţei biostructurale a undelor electroencefalografice* stau următoarele premise: biostructura se poate destrăma parţial, punînd în libertate apă, ioni şi alte substanţe; destrămarea parţială a biostructurii este reversibilă; refacerea biostructurii parţial destrămate necesită un consum de energie biochimică.

Printre fenomenele care intervin în producerea undelor electroencefalografice au fost examinate: eliberarea şi apoi integrarea în biostructură a ionilor, apei şi altor substanţe; schimbul de ioni şi de apă între soluţia intracelulară şi mediul extracelular; influenţa acestui schimb asupra polarizării membranei celulare şi asupra concentraţiei soluţiei intracelulare; activitatea mecanismului de autoreglare, care, consumînd energia biochimică, asigură refacerea biostructurii după ce destrămarea ei parţială a atins un anumit prag. Desfăşurarea periodică a acestor fenomene, dintre care unele sînt antagoniste, duce la variaţia periodică a concentraţiei ionilor în soluţia intracelulară, care, la rîndul ei, determină variaţia potenţialului bioelectric celular şi apariţia undelor electroencefalografice. Traseul acestor unde depinde atît de modul de desfăşurare şi de intensitatea fiecăruia dintre fenomenele amintite, cît şi de starea biostructurii însăşi. Impulsurile rezultate din activitatea receptorilor şi a sistemului nervos ca atare, acţionînd asupra biostructurii, pot de asemenea provoca modificări în traseul ritmului electroencefalografic.

Frecvenţa undelor electroencefalografice este condiţionată de frecvenţa pulsaţiilor biostructurii, amplitudinea acestor unde depinde de variaţia concentraţiei ionilor în soluţia intracelulară în raport cu aceea a mediului extracelular, iar mărimea acestor doi parametri este determinată de grosimea stratului biostructural care se destramă şi se reface cu ocazia fiecărei pulsaţii.

Consideraţiile de mai sus au permis explicarea aspectului bifazic al undelor electroencefalografice, dependenţa amplitudinii acestor unde de frecvenţa lor, apariţia fusurilor în traseurile ritmurilor electroencefalografice şi blocarea acestor ritmuri sub acţiunea prelungită a stimulilor senzoriali (192).

În problema originii vieţii pe Pămînt, de asemenea a apărut un nou punct de vedere. Conform concepţiei biostructurale, trecerea de la materia nevie la materia vie s-a realizat printr-o schimbare calitativă a materiei, şi anume prin apariţia materiei biostructurate. Această materie

s-a format prima dată direct în apele oceanului primar atunci cînd au fost satisfăcute simultan două condiţii esenţiale, şi anume :

— compoziţia apelor oceanului a atins acel stadiu evolutiv care a permis formarea substanţelor capabile să devină componente ale materiei biostructurate ;

— s-a asigurat aportul de energie necesar atît transformării moleculelor anumitor substanţe în componente ale materiei biostructurate, cît şi menţinerii integrităţii materiei biostructurate ce s-a format.

La început, materia biostructurată a avut schimbul metabolic direct cu mediul în care se afla şi numai ulterior s-a diferenţiat „soluţia internă", căreia i-a revenit rolul de intermediar în aceste schimburi. Astfel s-au creat condiţiile pentru apariţia primei protoplasme primitive (195).

În fine, s-a luat în considerare *semnificaţia biostructurii în alergologie*. Conform concepţiei biostructurale în apariţia şi menţinerea stărilor alergice, un rol important îi revine materiei biostructurate. Integrarea directă sau indirectă a alergenelor în biostructură modifică starea acesteia şi duce la apariţia unor modificări patologice în organism. Atîta timp cît alergenul se află în materia biostructurată a bolnavului, aceste modificări persistă. În atare condiţii se impune aplicarea tratamentelor care pot facilita eliminarea alergenilor din biostructură şi apoi din organism. De asemenea trebuie avut în vedere că uşurinţa pătrunderii şi reţinerii alergenilor în biostructură depinde de starea acesteia. Astfel se explică sensibilitatea sau lipsa de sensibilitate a omului faţă de alergeni. Toate acestea sînt legate şi de mecanismele imunologice de apărare contra alergenilor (197).

Se constată deci că concepţia biostructurală îşi găseşte aplicabilitatea în cele mai diferite domenii ale biologiei şi permite elaborarea de noi teorii şi ipoteze specifice domeniilor respective. Înseamnă că testarea teoretică a valabilităţii concepţiei biostructurale a dat un rezultat pozitiv.

2. TESTAREA EXPERIMENTALĂ A CONCEPŢIEI BIOSTRUCTURALE BAZATĂ PE CERCETĂRI EFECTUATE ÎN ALT SCOP

Testarea experimentală a valabilităţii concepţiei biostructurale ridică următoarea problemă : dacă biostructura există, atunci de ce prezenţa ei în materialul biologic cercetat nu a fost încă sesizată ? Doar este greu de admis ca existenţa acestei structuri, specifică viului, să nu se fi oglindit într-un fel sau altul în rezultatele numeroaselor cercetări efectuate pînă acum.

Răspunsul este lesne de dat. Convinşi de aplicabilitatea universală în biologie a concepţiei moleculare şi nebănuind existenţa biostructurii, cercetătorii îşi interpretau rezultatele experimentale de pe poziţiile concepţiei menţionate unanim admise şi astfel ajungeau la concluzii a căror justeţe li se părea asigurată. Tocmai datorită acestei împrejurări, unele rezultate nu tocmai concordante cu cerinţele concepţiei moleculare au fost cîteodată trecute cu vederea sau semnalate fără a li se da vreo explicaţie ; se mai întîmpla că ele se interpretau astfel încît li se asigura concordanţa cu concepţia moleculară sau se foloseau ca bază pentru enunţarea de ipoteze noi, dar de asemenea încadrabile în această concepţie.

De aceea revizuirea de pe poziţiile teoriei biostructurii a multor lucrări publicate pînă acum poate permite eventual:

— valorificarea dintr-un nou punct de vedere a rezultatelor experimentale obţinute de autorii acestor lucrări;

— formularea unor noi concluzii, la care autorii lucrărilor respective nici nu s-au gîndit;

— confirmarea existenţei biostructurii pe baza cercetărilor experimentale efectuate cu totul în alt scop.

Se înţelege că în cadrul acestei revizuiri vor trebui luate în considerare în primul rînd rezultatele experimentale publicate de autorii lucrărilor respective şi nu concluziile la care ei au ajuns pe baza concepţiei moleculare.

În consecinţă, au fost revizuite de pe poziţiile concepţiei biostructurale unele lucrări publicate cu mult înaintea apariţiei acestei concepţii. Ca primul exemplu poate servi lucrarea *Über die Ionenpermeabilität des quergestreiften Muskels* de R. Mond şi K. Amson, publicată în 1928. Aceşti cercetători au descoperit că ionii de potasiu din lichidul de perfuzie ar trece în muşchii vii contra gradientului de concentraţie dacă concentraţia lor în acest lichid depăşeşte valoarea-prag de 13 mg%. Semnificaţia biochimică şi fiziologică a acestui „prag de potasiu" nu a putut fi lămurită. Cum însă rezultatul menţionat nu concordă cu cerinţele concepţiei moleculare (teoria membranei), autorii au căutat să-l interpreteze recurgînd la o ipoteză suplimentară: ei au presupus că în schimbul ionic dintre lichidul de perfuzie şi musculatura trenului posterior de broască intervin şi ionii de hidrogen, şi cei de amoniu rezultaţi din metabolism. Or, teoria biostructurii nu numai că lămureşte precis semnificaţia biochimică şi fiziologică a „pragului de potasiu", dar prin interpretarea cantitativă a datelor experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson demonstrează că ipoteza suplimentară propusă de aceşti autori nu este necesară (180), (486).

O altă lucrare revizuită de pe poziţiile concepţiei biostructurale a fost aceea publicată în anii 1955 de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes şi intitulată *Active transport of cations in giant axons from* Sepia *and* Loligo. Aceşti autori au constatat că efluxul ionilor de sodiu din axonii giganţi vii de *Sepia*, încărcaţi cu sodiu radioactiv şi introduşi apoi în apa de mare, s-ar face contra gradientului de concentraţie. Cum însă acest rezultat nu concordă cu cerinţele concepţiei moleculare (teoria membranei), autorii au căutat să-l explice recurgînd la o ipoteză suplimentară: ei au presupus existenţa unei ipotetice pompe de sodiu, care, consumînd o parte de energie metabolică, ar pompa continuu din axoni ionii de sodiu care pătrund în ei din mediu extern şi astfel ar menţine în axoplasmă concentraţia scăzută şi constantă a acestor ioni, inferioară aceleia din apa de mare. Or, teoria biostructurii nu numai că explică cauzele fenomenului constatat de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes, dar permite stabilirea expresiei matematice a legii după care se produce efluxul respectiv, demonstrînd astfel că ipoteza pompei de sodiu nu este necesară.

Dar nu numai atît, cercetînd efluxul ionilor de sodiu din axonii giganţi de *Sepia* încărcaţi mai întîi cu sodiu radioactiv şi introduşi apoi în apa de mare, autorii menţionaţi au constatat că sub acţiunea inhibitorilor metabolici intensitatea acestui eflux scade, dar revine la normal după în-

depărtarea inhibitorilor din axoni. Bazaţi pe teoria membranei (concepţia moleculară), ei au interpretat fenomenul acesta admiţînd că sub influenţa inhibitorilor metabolici ar scădea activitatea pompei de sodiu, ceea ce ar duce la micşorarea efluxului menţionat. Or, concepţia biostructurală nu numai că dă o altă interpretare, mai firească, fenomenului descoperit de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes, dar ne-a permis să calculăm pe baza datelor experimentale publicate de aceşti autori atît modificările concentraţiei ionilor de sodiu în axon care se produc sub influenţa dinitrofenolului, cît şi cantitatea apei care se eliberează din biostructura axoplasmei datorită acestui inhibitor (186), (187), (486).

Se constată deci că, în conformitate cu anumite prevederi, concepţia biostructurală permite valorificarea dintr-un nou punct de vedere a rezultatelor experimentale obţinute de diferiţi cercetători şi formularea de noi concluzii, la care autorii lucrărilor respective nici nu s-au gîndit.

3. TESTAREA EXPERIMENTALĂ A CONCEPŢIEI BIOSTRUCTURALE PE BAZA CERCETĂRILOR EFECTUATE ÎN ACEST SCOP

Astfel de testări se fac de obicei pe baza principiului următor: dacă o concepţie teoretică nouă e bună, ea trebuie să permită prevederea unor fapte sau fenomene încă necunoscute şi neprevizibile de pe poziţiile altor concepţii. În cazul cînd cercetările experimentale confirmă realitatea faptelor sau a fenomenelor prevăzute, înseamnă că concepţia respectivă este justă.

Printre diferite fapte încă necunoscute care pot fi prevăzute pe baza concepţiei biostructurale, dar sînt de neprevăzut de pe poziţiile concepţiei moleculare actuale, s-ar putea lua în considerare pentru testare „creşterea proporţiei apei libere în ţesuturile vii în prezenţa inhibitorilor metabolici".

Într-adevăr, concepţia noastră prevede că existenţa biostructurii, alcătuită din apă şi diferite alte substanţe, necesită un aport de energie, ceea ce a şi fost enunţat în 1965 (178), atunci cînd nu dispuneam de metode de cercetare experimentală în acest domeniu. Ar fi deci de aşteptat ca inhibarea parţială a biochimismului celular şi reducerea concomitentă a producerii de energie să ducă la destrămarea parţială a biostructurii şi la eliberarea unei părţi a apei şi a altor substanţe cuprinse în ea (486). Prin urmare, ţesuturile vii, tratate cu inhibitorii metabolici, ca dinitrofenol, azidă de sodiu, arsenit de sodiu şi alte substanţe de acest gen, ar trebui să conţină mai multă apă „liberă" şi mai multe substanţe hidrosolubile „libere" decît ţesuturile-martor.

Numeroase cercetări, efectuate atît pe material vegetal, cît şi pe cel animal, au confirmat întru totul faptul prevăzut. Într-adevăr, s-a constatat că diferitele ţesuturi vii tratate cu inhibitori metabolici conţin mai multă apă liberă şi o cantitate sporită de substanţe hidrosolubile decît ţesuturile-martor (213), (214), (486), (487).

Este de subliniat că faptul menţionat nu poate fi prevăzut pe baza concepţiei moleculare, întrucît această concepţie susţine că în ţesuturile vii apa se găseşte numai sub două forme: liberă şi legată. Or, inhibitorii metabolici nu influenţează cantitatea apei legate, aşa că un surplus de

apă liberă în ţesuturile vii tratată cu inhibitori metabolici nu poate fi nici conceput şi nici explicat de pe poziţiile concepţiei moleculare.

Un fenomen încă necunoscut, dar previzibil de pe poziţiile concepţiei biostructurale este destrămarea sacadată a materiei biostructurate. Dată fiind repartiţia neuniformă a forţelor prin care se leagă în materia biostructurată diferitele ei componente, se poate prevedea existenţa în biostructură a unor linii de clivaj, unele mai rezistente, iar altele mai puţin rezistente şi deci susceptibile de a se desface mai uşor (172), (178). Cum trecerea de la o linie de clivaj la alta nu poate fi continuă, este de aşteptat ca cel puţin în anumite împrejurări destrămarea biostructurii să se facă „sacadat", în „trepte" (486).

Cercetările experimentale efectuate pe frunzele de porumb cu ajutorul azidei de sodiu ca inhibitor metabolic au demonstrat că într-adevăr atît apa, cît şi diferitele substanţe hidrosolubile cuprinse în biostructură sînt eliberate treptat sub influenţa concentraţiilor crescînde ale inhibitorului. Astfel, prin punerea în evidenţă a acestui fenomen, care nu poate fi prevăzut de pe poziţiile concepţiei moleculare, s-a confirmat justeţea previziunii bazate pe concepţia biostructurală (87).

Din cele de mai sus rezultă că concepţia biostructurală a permis prevederea unor fapte şi fenomene noi care nu pot fi prevăzute pe baza concepţiei moleculare şi că cercetările experimentale au confirmat justeţea previziunilor.

4. METODELE DE CERCETARE A MATERIEI BIOSTRUCTURATE

Conform concepţiei biostructurale, biostructura există numai în materialul biologic viu, deoarece se destramă odată cu moartea acestuia. Aşa se explică de ce cercetările efectuate pe material biologic mort, mojarat, omogenizat etc., nu permit nici punerea în evidenţă a biostructurii şi nici investigarea compoziţiei şi a însuşirilor ei. A devenit necesară elaborarea şi, respectiv, aplicarea unor metode adecvate care permit efectuarea cercetărilor pe material biologic viu. Astfel s-a ajuns pînă acum la două metode, şi anume metoda stoarcerii la presiuni hidrostatice mari şi metoda rezonanţei magnetice nucleare.

Metoda stoarcerii se bazează pe faptul constatat experimental că presiunile hidrostatice mari nu omoară ţesuturile vii, ceea ce înseamnă că nu provoacă destrămarea biostructurii acestora. De aceea, lucrînd în condiţii adecvate, se poate stoarce din materialul biologic viu apa lui liberă, obţinîndu-se un suc, numit convenţional „suc vacuolar". Dacă se stoarce un material biologic în prealabil omorît, atunci se obţine o cantitate mult mai mare de suc, numit convenţional „suc mixt", deoarece la sucul vacuolar se adaugă apa şi substanţele hidrosolubile eliberate din biostructură. Se înţelege că, în cazul stoarcerii materialului biologic viu şi îndepărtării din el a apei libere, reziduul rămas în presă continuă să fie viu, deoarece cuprinde biostructură. Prin omorîrea acestui reziduu şi stoarcerea lui se obţine un alt suc, numit „sucul plasmatic", provenit din apă şi din substanţele hidrosolubile eliberate din biostructură. Prin cercetarea cantităţii şi compoziţiei chimice a acestor sucuri obţinute în di-

ferite condiţii experimentale, se pot trage concluzii cu privire la alcătuirea şi însuşirile materiei biostructurate (213), (214), (224), (486), (487).

Pe cînd metoda stoarcerii, cu toată imperfecţiunea ei, permite investigarea materiei biostructurate, dînd indicaţii cu privire la comportarea acestei materii în diferite condiţii fiziologice şi experimentale, la destrămarea ei parţială sau totală, reversibilă sau nereversibilă, care se produce în diferite împrejurări, la natura chimică a componentelor din care este alcătuită şi, într-o anumită măsură, chiar la ordinea în care sînt aşezate componentele în interiorul ei, *metoda rezonanţei magnetice nucleare* poate furniza informaţii preţioase cu privire la libertatea de mişcare a diferitelor componente ale materiei vii. Cum integrarea în biostructură este sinonimă cu restrîngerea libertăţii de mişcare a acestor componente, iar eliberarea din biostructură este sinonimă cu creşterea acestei libertăţi, metoda rezonanţei magnetice nucleare poate arăta dacă anumite componente, de exemplu apa, sînt sau nu integrate în materia biostructurată şi permite urmărirea fenomenelor care se produc la nivelul biostructurii atunci cînd aceste componente se integrează în ea sau se eliberează din ea. Pînă acum a fost investigată numai starea apei în materia vie, recurgîndu-se la două variante ale acestei metode, şi anume metoda rezonanţei magnetice nucleare de înaltă rezoluţie şi metoda rezonanţei nucleare ecou de spin (224), (487).

Cu ajutorul metodelor menţionate, precum şi al altora, a fost efectuată o serie de cercetări prin care s-a pus în evidenţă existenţa biostructurii (193), (487). Astfel, la frunzele vii netratate şi tratate cu inhibitori metabolici s-a cercetat volumul sucurilor vacuolar şi plasmatic, precum şi cantitatea diferitelor substanţe hidrosolubile cuprinse în aceste sucuri (metoda stoarcerii) (213), (214), (486), (487), apa liberă existentă în acest material vegetal (metoda Marincik Okuntzov) (487) şi viteza de evaporare a apei după infiltrarea frunzelor prin metoda Kursanov. Paralel s-au înregistrat spectrele RMN de înaltă rezoluţie şi s-au măsurat timpii de relaxare de RMN ai protonilor apei din nervii vii netrataţi şi trataţi cu inhibitori metabolici (228), (487).

Rezultatele celor cinci serii de cercetări efectuate cu metode total diferite şi pe două categorii diferite de material biologic (frunze şi nervi) au demonstrat că inhibitorii metabolici pătrunşi în ţesuturile vii provoacă eliberarea unor cantităţi însemnate de apă şi de substanţe hidrosolubile, fenomen care nu a fost cunoscut pînă acum şi care nu poate fi explicat de pe poziţiile teoriilor şi ipotezelor actuale bazate pe concepţia moleculară despre alcătuirea materiei vii. Astfel s-a confirmat una din prevederile fundamentale ale concepţiei biostructurale, după care existenţa materiei biostructurate depinde de aportul de energie metabolică. Într-adevăr, inhibitorii metabolici introduşi în ţesuturi frînează procesele metabolice, micşorînd astfel producerea de energie, ceea ce are ca efect destrămarea parţială a materiei biostructurate (486), (487).

5. COMPOZIŢIA ŞI ÎNSUŞIRILE MATERIEI BIOSTRUCTURATE

Analiza chimică a sucului plasmatic alcătuit din apă şi din substanţe hidrosolubile eliberate din biostructură, respectiv deosebirile dintre compoziţia chimică a sucurilor mixt şi vacuolar, permite să se tragă concluzii

cu privire la componentele chimice din care este alcătuită materia biostructurată. Aplicînd aceste procedee, s-a putut stabili că materia biostructurată, atît a ţesuturilor vegetale, cît şi a celor animale, este alcătuită din diferite substanţe organice şi minerale şi cuprinde o cantitate relativ mare de apă (188), (208), (211).

Printre componentele chimice ale materiei biostructurate au fost identificate pînă acum : proteinele (487), aminoacizii (64), (65), substanţele reducătoare (230), acizi nucleici (304), (487) şi diferite enzime (88), (213), (487), iar printre componentele minerale ionii de potasiu, de calciu şi de sodiu (63), (88), (208), (226), (486), (487), precum şi anionii de fosfaţi (213).

Deşi metoda stoarcerii aplicată pentru obţinerea acestor date nu este exactă şi, prin urmare, nu poate da decît indicaţii aproximative, totuşi în anumite împrejurări ea poate furniza informaţii interesante nu numai cu privire la compoziţia chimică a materiei biostructurate, ci şi la ordinea de aşezare a componentelor în această materie. În acest scop se poate recurge la fracţionarea în timp a sucului plasmatic, procedînd după cum urmează : reziduul rămas în presă după stoarcerea sucului vacuolar din materialul biologic viu conţine, după cum s-a mai arătat, materia biostructurată. În loc însă ca acest reziduu să fie omorît pentru a realiza destrămarea materiei biostructurate şi obţinerea printr-o nouă stoarcere a sucului plasmatic, reziduul este scos din presă şi lăsat să moară lent la temperatură coborîtă, de exemplu în frigider la +4°C. Astfel, în condiţiile „morţii lente", biostructura se destramă lent şi progresiv. De aceea prin stoarceri la anumite intervale de timp (de exemplu din 24 în 24 de ore) se obţin fracţiuni succesive ale sucului plasmatic. Se poate admite că la început se desprind din materia biostructurată componentele aflate în straturile ei superficiale şi, pe măsură ce destrămarea progresează, urmează straturile tot mai adînci. În aceste condiţii, analiza chimică a fracţiunilor succesive ale sucului plasmatic dau posibilitatea de a judeca dacă o anumită componentă se găseşte mai aproape de suprafaţa materiei biostructurate sau mai în adîncul ei şi cît de neuniformă este răspîndirea diferitelor componente în masa biostructurii. Cercetările efectuate în acest fel au scos în evidenţă faptul că repartiţia diferitelor componente nu este uniformă şi poate varia în funcţie de condiţiile mediului în care se găseşte ţesutul cercetat (212), (487).

În privinţa însuşirilor materiei biostructurate s-a descoperit că ea are capacitatea de a exista numai în protoplasma vie. Prin această însuşire, materia biostructurată se deosebeşte fundamental de materia moleculară nevie. După cum s-a arătat, odată cu moartea protoplasmei, materia biostructurată se destramă, iar componentele ei se adaugă la soluţia intracelulară. De aceea în ţesuturile omorîte apa liberă şi diferitele substanţe hidrosolubile se găsesc în cantitate mult mai mare decît în ţesuturile vii (213), (214), (486), (487).

O altă însuşire remarcabilă a materiei biostructurate, prin care ea se deosebeşte fundamental de materia moleculară nevie, este dependenţa integrităţii ei de energia metabolică. Orice restrîngere a intensităţii proceselor metabolice dătătoare de energie se repercutează asupra materiei biostructurate şi duce la labilizarea şi la destrămarea ei parţială. De aceea ţesuturile vii în care producerea de energie metabolică este micşorată

conţin apa liberă şi substanţele hidrosolubile în cantitate sporită (213), (214), (172), (176), (178), (286), (287).

Materia biostructurată se caracterizează şi prin termolabilitate. Rezultatele unor cercetări experimentale arată că, începînd de la 40°C în sus, materia biostructurată începe să se destrame parţial şi reversibil, iar de la 50—60°C în sus, în funcţie de natura materialului biologic cercetat, materia biostructurată se destramă ireversibil odată cu moartea ţesuturilor respective. Astfel, prin cercetarea comportării biostructurate la temperaturi diferite se poate stabili „temperatura mortală minimă" caracteristică fiecărui ţesut în parte şi dependentă de condiţiile de încălzire (486), (487).

Încă o însuşire caracteristică a materiei biostructurate constă în capacitatea ei de a răspunde prin destrămarea parţială şi reversibilă la acţiunea agenţilor excitanţi. Prin această însuşire, materia biostructurată se deosebeşte profund de materia moleculară nevie (63), (486), (487).

De asemenea trebuie menţionat că materia biostructurată, pe lîngă însuşiri comune, independente de natura organismelor din care face parte, mai prezintă şi unele comportări specifice pentru fiecare categorie de plante şi de animale. Aceste comportări depind de anumite particularităţi ale structurii şi prezintă interes pentru probleme care privesc hibridarea organismelor (174), (176), transplantarea de ţesuturi şi altele de acest gen. Se înţelege că, în conservatorismul materiei biostructurate, un rol important revine mecanismelor cibernetice de autoreglare cuprinse în structura ei (177), (178).

În fine, datorită „continuităţii" alcătuirii sale, materia biostructurată constituie acea ultrastructură celulară (196) care permite deplasarea rapidă şi pe distanţe mari a electronilor dislocaţi, precum şi a altor particule încărcate electric. Astfel materia biostructurată serveşte ca suport pentru aşa-zisa „bioplasmă" şi condiţionează manifestările acesteia (487).

Cercetările teoretice şi experimentale efectuate pînă acum în domeniul materiei biostructurate deschid perspective largi pentru noi investigaţii teoretice şi aplicative în cele mai diferite domenii ale biologiei, agronomiei şi medicinii. Descrierea acestor posibilităţi noi nu intră în cadrul acestui referat. Menţionăm numai că unele cercetări de acest gen sînt începute şi urmăresc rezolvarea unor probleme de interes economic şi medical, cum ar fi rolul biostructurii în păstrarea stocurilor de legume şi fructe (514), în rezistenţa plantelor la agenţi nocivi (515), în alergii etc.

★

Acestea sînt, pe scurt, realizările Institutului de biochimie în legătură cu natura şi structura materiei vii şi cu perspectivele care se deschid în faţa cercetărilor dedicate acestei probleme.

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 391–399 (1972)

CERCETĂRI ÎN DOMENIUL BIOCHIMIEI PLANTELOR

VICTORIA ALEXANDRESCU, LUCIA BUZILĂ, DOINA POPOV, IOANA HAGIMA-CĂLIN
şi F. MIHĂILESCU

Cercetările în domeniul biochimiei plantelor au început încă din primii ani de existenţă ai Institutului de biochimie, fiind concretizate astăzi, la a 20-a aniversare, în aproximativ 100 de lucrări ştiinţifice originale. În referatul de faţă vom prezenta domeniile care au format obiectul preocupărilor cercetătorilor din institut, precum şi unele dintre realizările obţinute.

Prin 1953—1954, biologii şi agronomii atît din ţară, cît şi de peste hotare erau preocupaţi, printre altele, şi de procesul iarovizării grîului de toamnă şi al stimulării plantelor de cultură prin tratarea lor cu diferite substanţe. Se punea deci problema cunoaşterii proceselor biochimice care au loc în plantă în perioada iarovizării, pentru a putea cunoaşte şi astfel aprecia şi prevedea sfîrşitul acestui proces.

Cercetările noastre în domeniul biochimiei iarovizării grîului de toamnă s-au efectuat, în majoritate, prin metoda exosmozei (167). Folosirea exosmozei în anumite condiţii dă indicaţii preţioase în legătură cu desfăşurarea proceselor biochimice din plante şi în multe cazuri este în concordanţă cu variaţia componentelor în interiorul seminţei.

Prin cercetarea glutenului şi exosmozei ionilor de amoniu (251) s-au pus în evidenţă trei momente importante în evoluţia metabolismului proteic, care ar putea caracteriza, eventual, anumite etape prin care trec seminţele în cursul iarovizării. Primul moment este caracterizat prin apariţia în seminţe, în a 14—15-a zi de iarovizare, a ionilor de amoniu; în primele zile, amoniacul este captat, probabil, de acizii aspartic şi glutamic, care se transformă în amidele respective. Al doilea moment este caracterizat prin existenţa în a 35—37-a zi a unui conţinut maxim în azot amoniacal, iar al treilea moment în a 42-a zi, prin scăderea conţinutului ionilor de amoniu, probabil din cauza intensificării proceselor sintetice care utilizează amoniacul la formarea aminoacizilor şi a substanţelor proteice. Explicarea dată fenomenelor este susţinută şi prin urmărirea respiraţiei în perioada respectivă (210), (251).

Evoluţia fosforului anorganic (232), (323), urmărită prin extracţie şi prin exosmoză, şi evoluţia fosforului nucleic sînt în deplină concordanţă. La începutul perioadei de iarovizare s-a constatat o scădere progresivă a fosforului mineral, corespunzător cu o mărire a fosforului nucleic; urmează o perioadă în timpul căreia fosforul nucleic rămîne aproape constant şi căreia îi corespunde acumularea fosforului mineral, după care începe acumularea de acizi nucleici şi scăderea fosforului mineral.

Urmărirea evoluţiei exosmozei electroliţilor (97), (523) a arătat că există diferenţe mari între diferite soiuri de grîu ; astfel, un grup a evidenţiat prezenţa celor trei momente importante din perioada iarovizării, pe cînd alt grup a evidenţiat doar ultimele două momente.

Activitatea catalazei (1) şi a esterazei (446) este în continuă creştere în perioada iarovizării pînă aproximativ în ziua a 46-a. Exosmoza catalazei a fost pusă în evidenţă, dar ea are loc în foarte mică măsură. Interesant este faptul că microorganismele prezente pe suprafaţa seminţelor în perioada iarovizării şi care au proprietatea de a descompune apa oxigenată urmează aceeaşi evoluţie, probabil ca efect al metabolismului plantei în această perioadă.

Evoluţia componentelor studiate arată existenţa posibilităţii de a aprecia sfîrşitul acestui proces.

În problema stimulării plantelor prin tratarea lor cu diferite substanţe se impunea cercetarea transportului acestor substanţe prin tulpinile plantelor şi efectul lor asupra metabolismului respectiv.

Problema transportului substanţelor prin tulpinile plantelor a fost atacată după elaborarea metodei capilare, care permite urmărirea cantitativă a pătrunderii soluţiilor în plante (170), (171). După unii autori*), sistemul vaselor conducătoare care străbat organismul vegetal şi realizează legătura între organele plantei reprezintă un sistem pasiv, prin care deplasarea soluţiilor diferitelor substanţe se face datorită mai ales diferenţelor de presiune osmotică. Conform acestei concepţii, numită concepţia osmotică, prin vasele conducătoare se deplasează soluţiile ca atare, adică apa împreună cu toate substanţele dizolvate în ea. După alţi autori**, vasele şi fasciculele conducătoare ale plantelor reprezintă un sistem activ, în care transportul substanţelor şi al apei depinde în primul rînd de metabolismul ţesuturilor conducătoare, caracterizate printr-o accentuată activitate enzimatică şi respiraţie intensă. Conform acestei concepţii, numită concepţia metabolică, transportul substanţelor nu se face sub formă de soluţii ca atare, ci fiecare substanţă se deplasează prin protoplasma celulelor fasciculelor conducătoare, independent una de alta şi independent de apă.

Plecînd de la aceste două concepţii, s-a studiat relaţia care există între viteza de pătrundere a soluţiilor şi consumul de oxigen în prezenţa soluţiilor de cloramină, albastru de metilen, vitamină C, saponină, arsenit de sodiu, 2,4-dinitrofenol şi apă în tulpinile plantelor de *Solanum lycopersicum*, *Antirrhinum majus* şi *Capsicum annuum* (92). S-a constatat însă că rezultatele experimentale obţinute şi pot fi interpretate integral nici cu ajutorul concepţiei osmotice şi nici cu ajutorul concepţiei metabolice (215). În continuare s-a studiat migrarea pironinei şi a albastrului de metilen în tulpinile de balsamine (*Impatiens balsamina*) şi de tomate (*Solanum lycopersicum*) (216). S-a constatat că migrarea pironinei este mai rapidă decît aceea a albastrului de metilen şi că viteza de migrare a acestor doi coloranţi nu este influenţată de intoxicarea prealabilă a plantei cu arsenit de sodiu. În urma rezultatelor obţinute s-a elaborat o nouă teorie,

* E. Münch, *Die Stoffbewegung in der Pflanze*, Jena, 1930.
** W. Schumacher, M. Hülsbruch, Planta, *45*, 118 (1955).

numită teoria adsorbtivă, conform căreia sistemul conducător al tulpinii se comportă, în anumite condiții, ca o coloană de adsorbție, în lungul căreia migrarea diferitelor soluții și substanțe se efectuează după regulile și legile cromatografiei. Admiterea teoriei adsorbtive cu privire la migrarea substanțelor în plante nu înseamnă însă combaterea celorlalte teorii, osmotică și metabolică, deoarece problema modului și a posibilităților de migrare a substanțelor în plante este prea complexă pentru a fi redusă în ansamblul ei la intervenția unui singur factor: osmotic, metabolic sau adsorbtiv.

Tratarea semințelor și plantelor cu diferite substanțe a determinat preocupări în trei direcții de cercetare. Lucrările efectuate în acest domeniu au urmărit: 1) pătrunderea diferitelor soluții și lichide biologice în plante; 2) transformările biochimice pe care le suferă diferitele substanțe introduse în plante; 3) modificările biochimice intervenite la nivelul diferitelor metabolisme ca urmare a introducerii unor substanțe.

1. Pătrunderea diferitelor soluții și lichide biologice în plante s-a efectuat prin două metode: metoda endosmozei, la semințe (167), (169), și metoda capilară, la plante (170), (463). S-a cercetat, direct sau indirect, pătrunderea și, respectiv, ieșirea unor substanțe din semințe (202), reținerea substanțelor de către semințe (447) și modificarea procesului respirator, a activității catalazei și exosmoza electroliților (3), (89). Prin metoda capilară s-a constatat că se pot introduce în plantă diferite substanțe, enzime, acizi nucleici (90), (92), (239), precum și sucuri de plante, ceea ce a determinat formularea unor concepții în problema hibridării vegetative (174), (176).

2. Transformările biochimice suferite de substanțele introduse extraradicular în plante (250), (316) s-au cercetat prin urmărirea asimilării azotatului de amoniu și a comportării heteroauxinei introduse în plante. Din aceste lucrări s-a desprins faptul că azotul anorganic introdus în plante este transformat în compuși organici, iar heteroauxina, la un interval de cîteva zile (cinci) de la întreruperea tratamentului, nu se mai regăsește liberă.

3. Modificările intervenite în metabolismul plantelor în urma tratamentului extraradicular s-au urmărit asupra metabolismului proteic. Astfel s-a urmărit acțiunea prolinei asupra aminoacizilor totali și a proteinelor din floarea-soarelui (plantă care nu o conține liberă) (249), influența ARN-ului asupra acumulării substanțelor proteice din plante (448), influența glucozei și a zaharozei exogene asupra valorilor azotului proteic și a azotului total din *Solanum lycopersicum* (34), acțiunea dihidrofoliculinei și testosteronei asupra catalazei foliare și a consumului de oxigen la tulpinile de *Solanum lycopersicum* și *Antirrhinum majus* (91), constatîndu-se că un aport exogen de substanțe atrage modificări la nivelul metabolismului proteic, al consumului de oxigen, al activității catalazei foliare etc.

În această perioadă s-au întocmit și unele protocoale cerute de diferite unități privind determinarea activității unor enzime (510), (513), (516), izolarea pectinelor din tulpinile de in și de cînepă (517) și s-au efectuat lucrări de colaborare privind sporirea producției de tomate și a vitaminei C prin tratare cu stimulenți chimici (31), (403), (518), cerce-

tări privind germinația semințelor de frasin (149), (305) și fenomenul de uscare a stejarului (47).

În continuare, cercetările au fost axate pe studierea proteinelor din plante, cu două scopuri : de a caracteriza evoluția proteinelor în ontogenia plantelor superioare și de a stabili diferențe calitative taxonomice între genuri, varietăți și soiuri. Pentru plantele dicotiledonate, cercetările au început în 1957, iar pentru plantele monocotiledonate în 1960. Cercetările au urmărit în special caracterizarea proteinelor, în funcție de sarcina electrică globală și de caracterul lor antigenic.

La plantele dicotiledonate, la fasole (*Phaseolus vulgaris*), la bob (*Vicia faba*) și la mazăre (*Pisum sativum*), s-au cercetat atît proteinele protoplasmatice, cît și cele de rezervă. S-au caracterizat proteinele din semințe, modificările care au loc în timpul germinației, proteinele din frunze și un grup de proteine vegetale numit crioproteine. Astfel s-a arătat că globulinele din sămînța de fasole pot fi fracționate prin electroforeză și prin desalifiere în trei componenți. Fracțiunea albuminică este constituită din doi componenți și se află într-o cantitate de 5—6 ori mai mică decît fracțiunea globulinică (98), (524). Studiind modificările proteinelor din sămînța de fasole în timpul germinației, s-a stabilit că după 9 zile de la începutul experienței globulinele sînt hidrolizate în proporție de 66%, în timp ce albuminele de 12%. Hidroliza fracțiunilor globulinice decurge în mod diferit începînd cu a 6-a zi de germinație (99), (101).

Proteinele din citoplasmă și din sucul vacuolar al frunzelor de fasole au fost studiate cu ajutorul metodelor electroforetice și cromatografice. S-au relevat doi compuși în proteinele citoplasmatice și trei compuși în proteinele vacuolare. Unul dintre compușii proteinelor vacuolare este un complex hidrosolubil în apă distilată, proprietate prin care proteinele vacuolare se disting net de cele citoplasmatice. Analiza cromatografică a arătat că proteinele vacuolare conțin aminoacizi specifici, ca cisteina, iar proteinele protoplasmatice conțin histidină, lizină și acid aspartic (100).

Urmărindu-se evoluția caracterului proteic în ontogeneza plantelor superioare, s-a stabilit (113) că proteinele din cotiledoanele de fasole nu sînt identice cu cele din restul embrionului. Proteinele protoplasmatice sînt distribuite în ambele formații, în timp ce proteinele de rezervă se găsesc numai în cotiledoane. Fiecare formație conține proteine protoplasmatice specifice, alături de alte proteine protoplasmatice pe care le conține în comun cu cealaltă formație. S-a demonstrat că proteinele de rezervă din cotiledoane sînt depuse în celule sub forma unui complex glucolipoproteic.

S-a mai arătat că diferitele stadii de dezvoltare morfogenetică a plantelor sînt precedate de transformări ale caracterului proteic, care constau în apariția timpurie a antigenelor specifice organelor. Astfel, înainte de germinație, proteinele din cotiledoanele semințelor de bob (*Vicia faba*) (115) sînt identice din punct de vedere imunochimic cu proteinele ce se găsesc în celelalte părți ale embrionului (gemulă, tulpiniță și rădăcină luate împreună), ceea ce deosebește sămînța de bob de cea de fasole. După declanșarea procesului germinativ se observă o diminuare a numărului de antigene care pot fi identificate cu ajutorul unui ser imunospecific antirest embrion negerminat. Micșorarea numărului de antigene din restul embrionului germinat este provocată de hidroliza proteinelor. Unul dintre

antigene s-a găsit a fi comun tuturor fazelor de dezvoltare ale plantei.

Studierea caracterului proteinelor citoplasmatice din frunzele de bob (116) a arătat că antigenele specifice frunzelor mature apar într-un anumit moment al dezvoltării lor, determinat, probabil, de complicarea metabolismului cu procese biochimice noi, în care fotosinteza joacă un anumit rol. Ele apar numai în momentul în care frunza a căpătat o structură morfologică caracteristică maturității. Între proteinele frunzei mature și cele ale restului embrionului există o înrudire imunochimică care se bazează pe prezența a trei antigene posedate în comun.

Studierea mecanismelor de acumulare și de hidroliză a proteinelor (104) a permis enunțarea unor concepții originale privitoare la mecanismul de acumulare a proteinelor de rezervă în semințe în cursul coacerii (455), la mecanismul de hidroliză a globulinelor de rezervă în fazele timpurii ale germinației (103), (456) și la transformarea antigenelor foliare în procesul de morfogeneză (120), (457).

În semințele majorității plantelor superioare (114) există un grup de proteine care au însușirea de a precipita din soluțiile lor apoase prin scăderea temperaturii mediului ambiant. Aceste proteine au fost denumite crioproteine, prin analogie cu crioglobulinele de origine animală. S-au efectuat o serie de lucrări cu privire la caracterizarea lor fizico-chimică, structura chimică și localizarea lor intraseminală și intracelulară. Crioproteinele sînt concentrate numai în anumite părți ale semințelor, în special în cotiledoane (119). Ele există în semințe sub forma unor asociații cu lipidele, fiecare tip de crioproteină legînd o cantitate caracteristică de lipide, cuprinsă între 2 și 10%. S-a demonstrat că fenomenul de crioprecipitare poate avea loc atît în extractele, cît și în sucurile plasmatice ale semințelor (117), (118). În aceste sucuri, substanțele minerale și glucidele îndeplinesc un rol principal în reglarea crioprecipitării.

S-a elaborat și o ipoteză cu privire la modul de intervenție al crioproteinelor în germinația semințelor (106). Potrivit acestei concepții, crioprecipitarea este un fenomen intracelular la care participă anumite proteine de rezervă ale seminței, de exemplu vicilina din mazăre, și prin care sămînța își încetinește sau își accelerează procesele biochimice care determină germinația în raport cu temperatura mediului ambiant. S-au adus date experimentale în favoarea ipotezei formulate, arătîndu-se că există un paralelism între temperatura critică de crioprecipitare a sucurilor plasmatice și temperatura minimă de germinație a semințelor din care provin aceste sucuri (118).

Pentru un studiu mai amănunțit s-a ales crioproteina din sămînța de mazăre. S-a obținut un preparat de crioproteină din mazăre prin precipitări repetate, preparat ce prezintă două componente (39). S-a stabilit corespondența dintre vicilină și crioproteina din mazăre, arătîndu-se că, deși cele două proteine sînt identice din punct de vedere imunochimic, ele diferă în ceea ce privește greutatea lor moleculară și proprietățile de afinitate pentru DEAE-celuloză (40). S-a arătat că ar fi posibil ca singura diferență dintre vicilină și criovicilină să fie gradul lor de polimerizare, criovicilina fiind monomer, iar vicilina dimerul ei (38). Pentru elucidarea celor de mai sus, vicilina s-a fracționat prin cromatografie pe DEAE-celuloză în două componente cu aceeași antigenicitate (121). De asemenea, prin fracționare pe geluri de agaroză cu uree sau amidon s-au

obţinut un mare număr de fracţiuni, ceea ce ar reprezenta subunităţile disociate ale moleculei intacte. Prin cromatografie pe Sephadex G-200 în uree 8 M au fost obţinute două componente cu greutate moleculară diferită. În procesul de germinaţie al seminţelor de mazăre (42), (43), moleculele de vicilină prezintă alterări structurale, manifestate printr-o creştere a mobilităţii electroforetice şi o scădere a eterogenităţii în medii gelificate care conţin uree 8 M. S-a constatat că în timpul germinaţiei vicilina din cotiledoanele de mazăre dă naştere unui fragment de hidroliză, care se menţine un timp îndelungat la acest nivel. Rezultatele au sugerat că în primele stadii de hidroliză proteinele de rezervă sînt scindate în fragmente mici, care se hidrolizează ulterior în peptide sau în aminoacizi.

La plantele monocotiledonate, cercetările s-au efectuat pe porumb (*Zea mays*) şi s-a lucrat numai cu proteinele protoplasmatice, proteina de rezervă, zeina, fiind insolubilă în sistemele-tampon folosite pentru extracţie; ea este solubilă în alcool 70%.

Cercetarea electroforetică a proteinelor acvosolubile din formaţiile seminţei de porumb negerminate, după germinare şi din primele frunze, efectuată pe hîrtie (4)—(7), gel de agar (8), (13), (14), (16), (20), (23) şi gel de poliacrilamidă (date în curs de publicare), ne-a permis scoaterea în evidenţă a unor caracteristici ale proteinelor din aceste organe, bazate pe sarcina electrică globală. Principalele concluzii sînt următoarele:

1. Formaţiile seminţei conţin proteine mai eterogene din punctul de vedere al sarcinii electrice globale decît formaţiile şi organele prezente în perioada germinării, şi acestea mai eterogene decît cele evidenţiate ulterior în primele frunze.

2. Marea majoritate a proteinelor extractibile sînt electronegative. Proteine electropozitive pot fi evidenţiate în special în scutelul şi endospermul seminţei negerminate. După germinare, endospermul mai conţine încă astfel de proteine timp de cîteva zile.

3. Organele plantei care se găsesc într-o etapă de creştere rapidă, deci cu un metabolism foarte activ, în primul rînd coleoptilul şi, în al doilea rînd, primele frunze, conţin proteină a cărei sarcină electrică globală este mai electronegativă decît a proteinelor axului embrionar al seminţei negerminate; în scutel şi endosperm, în perioada germinării, se constată acelaşi fenomen, dar mai redus.

Problema care se punea era în ce măsură proteinele din sămînţă se mai găsesc printre proteinele din organele prezente în alte etape de creştere. S-a ales urmărirea evoluţiei proteinelor după caracterul lor antigenic cu ajutorul serurilor imune de iepure antiproteină totală din organele şi formaţiunile analizate (8)—(10), (13), (14), (16).

Proteinele acvosolubile din axul embrionar al seminţei de porumb negerminate au evidenţiat cu un ser imun omolog prezenţa a 15 antigene. Axul embrionar conţine un singur antigen specific. Celelalte antigene sînt comune fie cu cele ale scutelului (10 antigene), fie cu cele ale endospermului (4 antigene).

Proteinele acvosolubile din plantulă, după 5—7 zile de germinare, au evidenţiat cu un ser imun omolog prezenţa a 14 antigene. Acestea sînt comune fie cu scutelul, fie cu endospermul din aceeaşi perioadă. Nu s-a găsit nici un antigen specific plantulei.

Proteinele acvosolubile din frunză au evidenţiat cu un ser imun omolog prezenţa a 11 antigene.

Compararea antigenelor axului embrionar, ale plantulei şi ale frunzelor ne-a arătat că în plantulă există 7 antigene comune cu cele ale axului embrionar, iar în frunze un singur antigen comun cu cele ale axului embrionar; frunza conţine 4 antigene comune cu plantula.

La reacţia directă dintre proteina din frunză şi serul antiax embrionar se evidenţiază trei antigene, iar între proteina din frunză şi serul antiplantulă şase antigene. La analiza inversă, dintre proteina din axul embrionar şi serul imun antifrunză, se evidenţiază 7 antigene, iar între proteina din plantulă şi serul imun antifrunză 11 antigene. Evidenţierea acestui număr mare de antigene la reacţia directă eterologă arată existenţa şi a unei identităţi antigenice parţiale între proteinele analizate.

Proteinele acvosolubile din *scutelul* seminţei negerminate au evidenţiat cu un ser imun antiscutel plus endosperm prezenţa a 11 antigene. După 5—7 zile de germinare, cu un ser imun omolog se observă prezenţa a 15 antigene. Avem deci de-a face fie cu o sinteză *de novo* de proteine care conţin alte grupări determinante decît cele din stadiul de sămînţă, fie cu o migrare a proteinelor din endosperm sau plantulă. Scutelul conţine două antigene specifice de formaţie, care sînt prezente atît în etapa de sămînţă negerminată, cît şi după germinare. Celelalte antigene din scutelul seminţei, atît negerminate, cît şi după germinare, sînt comune cu celelalte formaţii sau organe din perioada respectivă.

Proteinele acvosolubile din *endospermul* seminţei negerminate au evidenţiat cu serul imun antiproteină din scutel plus endosperm prezenţa a 8 antigene. Compararea antigenelor endospermului cu cele existente în aceeaşi formaţie după 5—7 zile de germinare ne arată că ele sînt toate prezente şi în această perioadă. Cu un ser imun obţinut cu scutel plus endosperm, după 5—7 zile de germinare s-a constatat existenţa a 11 antigene atît în etapa de sămînţă, cît şi după germinare. Diferenţa dintre serurile imune era datorată reacţiei slabe a animalelor faţă de antigenele endospermului seminţei. Endospermul conţine două antigene specifice de formaţie, care sînt prezente atît în etapa de sămînţă negerminată, cît şi după germinare. Restul antigenelor sînt comune cu celelalte formaţii sau organe din perioada respectivă.

Cercetările imunochimice efectuate confirmă existenţa unei eterogenităţi mai mari a proteinelor din axul embrionar al seminţei negerminate faţă de cele din plantulă şi ulterior din frunză, concluzie stabilită şi prin electroforeza acestor proteine. Proteinele scutelului în perioada germinării îşi măresc eterogenitatea din punct de vedere antigenic, pe cînd proteinele endospermului rămîn aceleaşi.

Cercetările electroforetice şi imunoelectroforetice prezentate s-au efectuat în paralel pe două soiuri de porumb din varietatea *indentata* şi pe două soiuri de porumb din varietatea *indurata*, fiecare cu serurile imune omologe pentru organul şi etapa de creştere studiată. Cercetările comparative efectuate nu au evidenţiat diferenţe calitative între varietăţi sau soiuri la nici una dintre etapele de creştere luate în studiu.

Diferenţe calitative trebuie să existe însă între soiuri şi varietăţi, care să le imprime particularităţile morfologice şi fiziologice, dar acestea nu au putut fi evidenţiate de noi prin metodele folosite. Credem că faptul

neevidenţierii lor se datoreşte complexităţii prea mari a proteinelor totale din extractele noastre şi posibilităţii restrînse a animalului (iepure) de a răspunde faţă de toate proteinele-antigene injectate în condiţiile adsorbţiei acestui material pe hidroxid de aluminiu.De aceea cercetările privind evoluţia proteinelor în primele etape de creştere a plantelor şi în vederea diferenţierilor dintre soiuri, varietăţi, specii, genuri etc. s-au continuat mergînd pe o altă cale, aceea a cercetării enzimelor.

În ultimii ani s-au înmulţit lucrările care arată că noţiunea de enzimă este mult mai complexă, ea cuprinzînd forme moleculare mai mult sau mai puţin asemănătoare din punctul de vedere al structurii şi compoziţiei părţii proteice.

Proteinele-enzime pot fi cercetate datorită acţiunii lor catalitice. Primele cercetări s-au efectuat în 1960—1961 cu enzimele amilolitice şi invertaza (4), (5) iar ulterior cercetările s-au continuat cu 4 enzime, şi anume catalaza (11), (12), (19), (20), (23), peroxidaza (15), (17), (18), (20), (23), (33), (146), fosfataza acidă (24)—(26), (311), (312) şi amilaza (21), (22), (274). Cercetările întreprinse au avut în vedere urmărirea multilaterală a acestor enzime, şi anume mărimea activităţii lor, comportarea în prezenţa diferitor efectori, numărul formelor moleculare decelabile după sarcina electrică globală şi proprietăţile lor antigenice.

Cercetările s-au efectuat pe porumb şi grîu, iar în unele cazuri ele s-au extins şi pe alte cereale. În cele de mai jos prezentăm concluziile principale obţinute în urma analizei electroforetice şi imunoelectroforetice.

Electroforeza a evidenţiat următoarele fapte :

a) cele patru enzime se găsesc sub forme moleculare multiple ;

b) în perioada germinării, spectrul electroforetic al izoenzimelor se modifică faţă de cel din sămînţă. Această modificare are loc în perioada primelor şase zile de germinare, în funcţie de enzima studiată ;

c) frunza conţine un spectru izoenzimatic mai mult sau mai puţin asemănător cu coleoptilul, în funcţie de enzima şi de planta studiată ;

d) formele moleculare ale acestor patru enzime din frunze sînt independente de prezenţa sau absenţa procesului de fotosinteză ;

e) varietăţile şi soiurile de porumb cercetate au prezentat acelaşi spectru izoenzimatic la aceste patru enzime ;

f) grîul de toamnă şi de primăvară prezintă acelaşi spectru izoenzimatic în primele 18 zile de creştere ;

g) deosebiri nete şi specifice în spectrele izoenzimatice ale enzimelor s-au găsit la liniile pure de porumb (date în curs de publicare) ;

h) tratarea unei linii de porumb cu neutroni aduce mari modificări morfologice, obţinîndu-se plante pitice şi înalte, dar din punctul de vedere al spectrului izoenzimatic găsim modificări mici doar în cazul catalazei şi peroxidazei, enzime pentru care se cunoaşte interdependenţa dintre ele şi hormonii de creştere (27).

Cercetarea imunochimică a formelor moleculare ale celor patru enzime din porumb, grîu şi ovăz ne-a dus la următoarele concluzii (lucrări în curs de publicare) :

1. Valoarea mobilităţii electroforetice nu este suficientă pentru a caracteriza o izoenzimă : izoenzime diferite din punct de vedere antigenic pot prezenta aceeaşi mobilitate electroforetică şi, invers, forme moleculare

cu mobilități electroforetice diferite pot fi identice din punct de vedere antigenic.

2. O enzimă din plante aparținînd unor genuri diferite există din punct de vedere antigenic sub forme moleculare specifice plantei; unele izoenzime din genuri diferite prezintă însă posibilitatea de a da reacții încrucișate.

3. Enzima poate exista în plantă: sub o singură formă moleculară, ca, de exemplu, α-amilaza din endospermul seminței germinate de grîu și peroxidaza din formațiile seminței de porumb negerminate; ca izoenzime care prezintă o identitate parțială din punct de vedere antigenic, ca, de exemplu, peroxidaza din porumb în perioada germinării; ca izoenzime complet diferite din punct de vedere antigenic, ca fosfataza acidă din frunzele de porumb, grîu, ovăz, și, în sfîrșit, ca izoenzime parțial asemănătoare alături de izoenzime complet diferite, ca α-amilaza din endospermul seminței de porumb germinate, peroxidaza din frunzele de porumb etc.

4. În cursul evoluției de la sămînță la plantă cu trei frunze apar izoenzime noi, ca, de exemplu, în cazul peroxidazei, care sînt diferite din punct de vedere antigenic.

5. S-a stabilit pe cale imunochimică că α-amilaza din porumb, grîu și ovăz este o enzimă care se găsește numai în perioada germinării, în special în endosperm. Sămînța și frunza conțin alte enzime amilolitice.

6. Catalaza din frunzele cerealelor (grîu, orz, ovăz și secară) este complet diferită din punct de vedere antigenic de catalaza hepatică de bou.

★

Acest referat a prezentat domeniile care au format obiectul preocupărilor colectivului de cercetători care lucrează în biochimia plantelor. Sumara prezentare a rezultatelor obținute a căutat să arate că domeniile de cercetare abordate au fost dintre cele mai importante, iar rezultatele obținute au adus date noi, experimentale și teoretice, care sînt la nivelul cercetărilor ce s-au făcut și pe plan mondial în acest domeniu.

Studierea proteinelor și a enzimelor rămîne și pe viitor printre preocupările noastre de bază.

Prezentat la redacție la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
București

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 401–408 (1972)

CERCETĂRI ÎN DOMENIUL ACIZILOR NUCLEICI ŞI AL NUCLEAZELOR

S. VASU, LILICA BOTOŞENEANU, SANDA RĂDULESCU şi ŞT. HULEA

Cercetarea sistemelor de reglare metabolică şi genetică care intervin în diferenţierea unor structuri subcelulare, celulare şi multicelulare este de o deosebită actualitate; în ultimii ani s-au obţinut în acest sens rezultate remarcabile, în special prin studierea sporogenezei şi germinării sporilor la bacterii, precum şi prin cercetarea „independenţei" biochimice şi, respectiv, interdependenţei unor formaţii subcelulare, cum sînt mitocondriile, cloroplastele, nucleele, ribozomii sau polizomii, în biosinteza proteinelor şi a unor specii moleculare de acizi nucleici. Prin aceste cercetări s-a evidenţiat rolul deosebit pe care îl au acizii nucleici şi unele enzime nu numai în păstrarea, transcrierea şi traducerea informaţiei genetice, ci şi în diferenţierea structurilor celulare, în sinteza unor componente structurale şi funcţionale ale acestora.

Luînd în considerare cele de mai sus, în strînsă legătură cu unele preocupări privind biosinteza enzimelor pectolitice (427), (429), (430), (433) şi distribuţia lor intra- şi extracelulară (430) în culturile de *Aspergillus niger*, începînd din 1967 s-au iniţiat în institutul nostru o serie de cercetări referitoare la acizii nucleici şi la activitatea unor nucleaze în procesele de creştere şi dezvoltare a unor specii din genul *Aspergillus*. Paralel cu acestea, s-au efectuat de asemenea cercetări privind acizii nucleici şi activitatea nucleazelor din plante superioare, în special în germinarea seminţelor şi la creşterea plantulelor de mazăre, precum şi din unele ţesuturi animale, îndeosebi din ţesutul muscular.

1. ACIZII NUCLEICI ŞI NUCLEAZELE DIN UNELE SPECII DE *ASPERGILLUS*

Atenţia deosebită acordată în ultimul timp unor specii de *Aspergillus*, în general ascomicetelor, pentru studierea proceselor morfogenetice de diferenţiere a diferitelor structuri subcelulare, celulare sau multicelulare, este justificată atît de unele particularităţi biologice remarcabile ale acestor microorganisme, cît şi de importanţa şi de implicaţiile economice ale lor în diferite sectoare de activitate.

Dacă în sensul celor arătate, pînă nu demult au predominat cercetările cu caracter pur morfologic şi uneori pur genetic, în ultimii ani însă aspectele biochimice şi fiziologice ale proceselor morfogenetice din ascomicete preocupă în mare măsură diferite colective de cercetare; în cadrul acestora

se circumscriu şi cercetările noastre privind acizii nucleici şi activitatea nucleazelor din unele specii de *Aspergillus*.

Privite în ansamblul lor, rezultatele obţinute de noi prin urmărirea acizilor nucleici şi a nucleazelor pe parcursul întregului ciclu de viaţă a fungului *A. niger*, respectiv în sporii în fază latentă după germinare, în creşterea şi dezvoltarea miceliului pînă în faza de depăşire a sporogenezei, au indicat o metabolizare relativ intensă atît a ADN, cît şi a ARN, care poate fi pusă în legătură cu diferenţierea unor structuri celulare de felul celor care se produc în germinarea sporilor, formarea primelor hife sau sporularea culturilor.

Astfel am arătat că după germinarea sporilor cantitatea de ADN creşte, urmînd curba de creştere a miceliului, apoi scade odată cu instalarea fazei staţionare de creştere, cînd, în condiţiile noastre experimentale, are loc sporularea masivă a culturilor, pentru ca ulterior să crească din nou şi să revină practic la valorile înregistrate iniţial. La rîndul ei, cantitatea de ARN este relativ mare în miceliul tînăr şi scade apoi continuu cu cît vîrsta culturilor creşte (429), (441). Cu toată această scădere continuă a cantităţii de ARN şi creştere a cantităţii de ADN, în anumite faze de dezvoltare a miceliului raportul ARN/ADN este net în favoarea ARN. Miceliul conţine o cantitate relativ mare de ARN (de ordinul zecilor de mg/g de miceliu uscat) şi una mică de ADN (de ordinul mg/g de miceliu uscat) (441), (443). Acelaşi raport favorabil pentru ARN l-am găsit şi în sporii de *A. niger* în faza latentă, cu toate că în spori, faţă de miceliu, are loc o concentrare a ADN (442).

Variaţiile cantitative ale acizilor nucleici înregistrate în creşterea şi dezvoltarea miceliului de *A. niger* sînt însoţite de modificări ale activităţii DN-azelor şi RN-azelor intra- şi extracelulare şi sînt totodată reflectate atît în spectrul electroforetic al acizilor nucleici obţinut în gel de agaroză, cît şi în nivelul substanţelor care absorb în ultraviolet la 256 nm, conţinute în fracţiunea acidosolubilă (acid percloric 0,5 M) din miceliu şi din mediul de cultură (317), (441), (443). Aşa, de exemplu, am arătat (317), (443) că activitatea DN-azelor şi RN-azelor în miceliu creşte odată cu scăderea cantităţii de ADN şi ARN, înregistrează un maxim în faza staţionară a creşterii, cînd conidioforul este bine dezvoltat şi ulterior începe să scadă, remarcîndu-se însă o creştere a activităţii lor în mediul de cultură.

Concomitent cu variaţiile cantitative ale acizilor nucleici şi activităţii nucleazelor, am arătat (441), (443) că se produc modificări în nivelul substanţelor care absorb la 256 nm, probabil, nucleotide şi oligonucleotide rezultate pe cale sintetică şi din degradarea unor specii de acizi nucleici. Nivelul acestor substanţe creşte în miceliul tînăr, scade în timpul sporulării culturilor, pentru ca ulterior să se menţină practic constant în miceliu şi să crească în mediul de cultură (443).

Pentru stabilirea modificărilor ce se produc în miceliul de *A. niger* la nivelul diferitelor specii moleculare de ADN şi ARN, am recurs la fracţionarea electroforetică a acizilor nucleici în gel de agaroză (432) sau de poliacrilamidă (434), (438).

Comparativ cu alte metode larg răspîndite şi folosite în fracţionarea acizilor nucleici, cum sînt ultracentrifugarea în gradient de densitate, cromatografia pe schimbători de ioni sau gelfiltrarea, electroforeza

în geluri de agaroză sau poliacrilamidă, după cum am arătat atît noi (432), (434), (441), ş.a., cît şi alţi autori, s-a dovedit a fi mult mai eficace, prezentînd o putere de rezoluţie mult mai mare. Este suficient în acest sens să avem în vedere doar unele rezultate privind fracţionarea acizilor nucleici chiar din *A. niger*. Astfel am arătat, de exemplu, că fracţiunile de ARN-citoplasmatici din *A. niger* (extraşi şi purificaţi cu fenol-8-hidroxichinolină în prezenţă de bentonită şi Na-dodecilsulfat) obţinute prin cromatografie pe albumină metilată-celită sau gelfiltrare prin geluri de poliacrilamidă (Biogel P 100 şi P 300), dextran (Sephadex G100 şi G200) şi agaroză (Sepharoză 2B, 4B şi 6B) sînt eterogene din punct de vedere electroforetic (438), fiind separate într-un număr mai mare sau mai mic de specii moleculare de ARN prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.

Folosind electroforeza în gel de agaroză (432) sau poliacrilamidă (438), am dovedit, de asemenea, că ARN-r din *A. niger* sînt mult mai eterogeni decît se stabilise prin ultracentrifugare analitică. În acest sens R.C. Moyer şi R. Storck (Arch. Biochem. Biophys., **104**, 193 (1964)) au arătat prin ultracentrifugare în gradient de zaharoză că ARN-r din *A. niger* conţin trei tipuri de ARN, cu coeficienţii de sedimentare 10S, 15S şi 19S. Prin analiza electroforetică a aceluiaşi preparat, noi am arătat (432), pe de o parte, că ARN-r din *A. niger* conţine circa 10—12 specii moleculare, care diferă între ele prin viteza lor de migrare în geluri, respectiv prin greutatea lor moleculară, şi, pe de altă parte, că speciile moleculare majore de ARN-r din *A. niger* trebuie să aibă coeficienţi de sedimentare ceva mai mari decît cei stabiliţi de autorii citaţi.

Analizînd electroforetic acizii nucleici extraşi şi purificaţi din unele formaţii subcelulare izolate din celulele hifale de *A. niger* (432), am arătat de asemenea că ARN-r mitocondriali sînt întrucîtva diferiţi de omologii lor citoplasmatici, ARN-r obţinuţi din microzomi; primii prezintă fracţii de greutate moleculară mare, care migrează în gelul de agaroză cu o viteză ceva mai mare decît fracţiile majore de ARN-r din microzomi. Recent, M. Edelman şi colab. (J. Mol. Biol., **49**, 67 (1970)), precum şi I.M. Verna şi colab. (J. Mol. Biol., **52**, 137 (1970)), au dovedit diferenţele care există între ARN-r mitocondriali şi omologii lor citoplasmatici în cazul fungului *A. nidulans* prin măsurători electroforetice, compoziţia în baze şi secvenţa acestora, precum şi prin determinarea mărimii lor moleculare prin microscopie electronică.

Revenind asupra modificărilor care se produc în cursul creşterii şi dezvoltării miceliului de *A. niger* la nivelul diferitelor specii moleculare de ADN şi ARN, menţionăm că acestea le-am stabilit, pe de o parte, prin analiza electroforetică în gel de agaroză a acizilor nucleici extraşi din miceliul de diferite vîrste şi, pe de altă parte, prin compararea acizilor nucleici obţinuţi din celule hifale şi spori în fază latentă. Astfel am arătat că spectrul electroforetic al acizilor nucleici devine mai eterogen odată cu începerea formării conidioforului şi se simplifică în oarecare măsură după sporularea culturilor (443). În timpul formării sporilor apare pe electroforegrame un număr sporit de fracţiuni de acizi nucleici, în special cu viteză de migrare mijlocie şi mare, fapt care poate fi pus în legătură cu intensificarea activităţii nucleazelor în miceliul care sporulează; intensitatea fracţiunilor majore de ARN-r scade şi se remarcă o oarecare tendinţă de

intensificare a fracţiei care reprezintă ADN de greutate moleculară mare (443).

Fracţionînd acizii nucleici prin electroforeză în gel de agaroză, am arătat că ADN şi speciile moleculare majore de ARN-r din sporii în fază latentă şi din miceliul de *A. niger* nesporulat se aseamănă între ei în mare măsură din punctul de vedere al migrării în gel (442). Parţial, aceste rezultate sînt similare cu cele obţinute de H.R. Henney şi R. Storck (J. Bacteriol., **85**, 822 (1963); Science, **142**, 1675 (1963)), care au dovedit, prin analiza coeficienţilor de sedimentare şi prin compoziţia în nucleotide, asemănarea care există între ribozomi, ARN-r şi ARN-s din ascosporii în fază latentă, conidiile şi hifele de *Neurospora crassa*. Prin electroforeză, noi găsim însă unele diferenţe între acizii nucleici din sporii în fază latentă şi cei din celulele hifale de *A. niger*; aceste diferenţe privesc atît numărul de specii moleculare de acizi nucleici identificate în urma electroforezei, cît şi migrarea în gel de agaroză a unora dintre ele.

Diferenţa dintre numărul de specii de ARN conţinute în spori şi cele din miceliul nesporulat ar putea fi pusă în legătură cu rezultatele noastre (442), (443) privind analiza electroforetică a acizilor nucleici extraşi cu fenol la diferite temperaturi. Se ştie că prin extracţia cu fenol la diferite temperaturi, în special între 55—65°C, se obţin ARN asemănători cu ADN uşor labilizabili, care, în general, manifestă activitate mesageră. Or, în aceste condiţii, în miceliu, spre deosebire de sporii în fază latentă, am identificat după electroforeză în gel de agaroză unele specii moleculare de ARN cu viteză de migrare mică şi mijlocie, care s-ar putea să manifeste activitate mesageră. Sporii în fază latentă par deci să nu conţină astfel de ARN, care, probabil, s-ar sintetiza în cursul germinării sporilor. Rezultatele obţinute de unii autori ar veni în sprijinul acestei presupuneri; într-adevăr, schimbarea compoziţiei nucleotidice a acizilor nucleici imediat după germinarea sporilor de *A. niger* (J. Hoshino şi colab., J. Gen. Appl. Microbiol., **8**, 233 (1962)) şi iniţierea sintezei proteice abia după cîteva ore de la incubarea acestora (T. Yamagita, Arch. Mikrobiol., **26**, 329 (1957)) ar putea fi interpretate în sensul lipsei ARN-m din sporii în fază latentă. De fapt, după K. Horicoshi şi Y. Ikeda (J. Agr. Biol. Chem. Japan, **29**, 724 (1968); Biochem. Biophys. Acta, **166**, 505 (1968)), sporii germinaţi proveniţi de la unele specii de *Aspergillus* se deosebesc de cei negerminaţi atît prin prezenţa polizomilor, cît şi prin capacitatea extractelor acelulare de a sintetiza proteine.

Referindu-ne la ARN-s, din rezultatele obţinute de noi au reieşit diferenţe între celulele hifale şi sporii în fază latentă. Aceste specii moleculare de ARN din celulele hifale de *A. niger* migrează la distanţa cea mai mare faţă de start (432); în cazul acizilor nucleici din spori, cea mai îndepărtată fracţiune faţă de start se situează la o distanţă mai mică decît aceea a ARN-s din celulele hifale (442), (443). Credem însă că diferenţa de migrare electroforetică dintre fracţiunile menţionate nu poate indica lipsa ARN-s din sporii de *A. niger* în fază latentă; aceasta cu atît mai mult, cu cît destul de recent s-a dovedit prezenţa ARN-s în sporii negerminaţi ai unor fungi (J.L. van Etten şi colab., J. Bacteriol., **100**, 1182 (1969)). S-a arătat însă că ARN-s din sporii negerminaţi devin activi — îşi manifestă activitatea de acceptare a aminoacizilor — numai în prezenţa unor extracte enzimatice din sporii germinaţi. Ar fi deci posibil ca sporii de

A. niger în fază latentă să conţină ARN-s. Moleculele acestora ar fi întrucîtva modificate faţă de ARN-s din celulele hifale; ele ar deveni active abia după germinarea sporilor, la cîteva ore de incubare, cînd de fapt devine evidentă şi sinteza proteică.

Metabolizarea relativ intensă a acizilor nucleici în creşterea şi dezvoltarea fungului *A. niger*, ca şi eterogenitatea moleculară relativ accentuată a ARN din miceliul de diferite vîrste, ne-a determinat ca în cercetările noastre să aprofundăm unele aspecte privind activitatea nucleazelor, în special a RN-azelor, atît din culturile acestui fung, cît şi din alte specii ale genului *Aspergillus*.

În legătură cu modificarea activităţii nucleazelor în miceliul de *A. niger* şi eliberarea acestor enzime în mediile de cultură, am urmărit, pe de o parte, distribuţia intra- şi extracelulară a RN-azelor în funcţie de vîrsta culturilor şi, pe de altă parte, prin folosirea unei tehnici noi elaborate în institutul nostru pentru vizualizarea fracţiunilor proteice cu activitate RN-azică în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă (317), (436), am stabilit formele moleculare multiple ale acestor enzime.

Separînd diferitele formaţii subcelulare din celulele hifale, am arătat că RN-azele conţinute în nuclee, mitocondrii, microzomi şi citoplasma lipsită de formaţii (supernatantul de la 105 000 g) diferă între ele atît din punct de vedere molecular şi al pH-ului optim de acţiune, cît şi în ceea ce priveşte participarea lor la metabolizarea ARN din miceliul de diferite vîrste (440). Astfel am stabilit că activitatea RN-azelor din nuclee, mitocondrii şi microzomi este maximă la pH slab acid (pH=6,2—6,8), iar a celor din citoplasma lipsită de formaţii şi din mediul de cultură este optimă la pH acid (pH=4,0—4,5). În urma electroforezei în gel de poliacrilamidă, în formaţiile subcelulare şi în mediul de cultură am evidenţiat circa 5—7 fracţiuni cu activitate RN-azică; nucleele, mitocondriile şi microzomii conţin RN-aze cu mobilitate electroforetică relativ mică faţă de unele RN-aze identificate în citoplasma lipsită de formaţiuni, a căror mobilitate în gelul de poliacrilamidă este mare. La rîndul lui, mediul de cultură se deosebeşte de formaţiile subcelulare din miceliu prin faptul că nu conţine decît RN-aze cu mobilitate electroforetică mare, întru totul asemănătoare cu a unora din RN-azele identificate în citoplasma lipsită de formaţii (317), (440). Mobilitatea electroforetică identică a acestor RN-aze, ca şi pH-ul lor optim acid, ar putea fi un indiciu că RN-azele extracelulare sînt eliberate în mediul de cultură din citoplasma lipsită de formaţii (317), (440).

Am arătat de asemenea că sporii de *A. niger* în fază latentă, în comparaţie cu celulele hifale, manifestă o slabă activitate RN-azică. Activitatea RN-azică din spori este mai mare la pH acid (pH=4,4), iar în urma electroforezei se repartizează pe două fracţiuni proteice cu mobilitate relativ mare, întru totul asemănătoare cu a unora din RN-azele conţinute în citoplasma celulelor hifale sau eliberate în mediul de cultură (440).

Urmărind unele din aspectele menţionate mai sus în funcţie de vîrsta culturilor de *A. niger*, rezultatele obţinute au indicat, în special în miceliul tînăr, o sinteză accentuată a RN-azelor de pH slab acid, iar ulterior, în miceliul care sporulează, o intensificare puternică a activităţii RN-azelor de pH optim acid. Luînd în considerare aceste rezultate şi punîndu-le în legătură cu cele obţinute în studiul acizilor nucleici din *A. niger*,

ar fi posibil ca RN-azele de pH slab acid să acţioneze în metabolismul normal de creştere (de exemplu în metabolizarea ARN-r sau a altor specii moleculare de ARN) din celulele hifale tinere, în care procesele de sinteză a ARN ar fi mai accentuate decît cele de degradare, iar RN-azele de pH optim acid să fie implicate în degradarea ribozomilor, care are loc odată cu acidifierea citoplasmei, intensificarea activităţii acestor enzime şi sporularea culturilor. De fapt, după cum am arătat mai înainte, creşterea activităţii RN-azice la pH=4,5 odată cu formarea conidioforului este însoţită atît de degradarea speciilor moleculare majore de ARN-r, cît şi, în general, de sporirea numărului de fracţiuni de acizi nucleici, identificate în urma electroforezei în gel de agaroză (441), (443).

Aprofundarea în viitor a cercetărilor noastre privind eterogenitatea moleculară a ARN şi complexitatea sistemului RN-azic din fungi implica selectarea unor suşe sau specii de *Aspergillus* omoloage sau eteroloage, pe de o parte cu activitate RN-azică mică, în vederea utilizării lor în special pentru studiul ARN, şi, pe de altă parte, cu activitate RN-azică mare în vederea folosirii lor la cercetarea propriu-zisă a acestor enzime şi la obţinerea unor preparate enzimatice de o anumită specificitate. În acest sens, urmărind activitatea RN-azelor intra- şi extracelulare dintr-un număr mare de tulpini şi specii care reprezentau toate cele 18 grupe de specii ale genului *Aspergillus*, am reuşit să selectăm suşele dorite, cu activitate RN-azică mică sau mare, şi totodată să arătăm că evidenţierea formelor moleculare multiple ale acestor enzime, după tehnica descrisă de noi (317), (436), poate constitui un criteriu taxonomic experimental în cadrul genului *Aspergillus* (439).

2. ACIZII NUCLEICI ŞI NUCLEAZELE DIN PLANTE SUPERIOARE

În strînsă legătură cu preocupările noastre fiind acizii nucleici şi nucleazele în procesele morfogenetice, s-au efectuat în institutul nostru unele cercetări şi pe plante superioare, în special pe mazăre.

Considerînd că în procesul germinării seminţelor şi al creşterii plantulelor are loc o diferenţiere accentuată de structuri multicelulare şi la nivel subcelular, cercetările noastre în acest domeniu s-au referit pînă în prezent la eterogenitatea moleculară a acizilor nucleici şi a nucleazelor, pe de o parte din formaţiile seminţelor de mazăre negerminate şi, pe de altă parte, din organele plantulelor după timpi diferiţi de la germinarea seminţelor. Astfel am arătat (35) că acizii nucleici extraşi din axul embrionar şi din cotiledoanele seminţelor negerminate, precum şi din frunzele, tulpinile, rădăcinile şi cotiledoanele plantulelor de mazăre, sînt fracţionaţi prin electroforeză în gel de agaroză în 10—15 specii moleculare diferite, corespunzătoare ADN, ARN-r şi ARN-s. Dacă, din punct de vedere electroforetic, între acizii nucleici din axul embrionar şi cotiledoanele seminţelor negerminate am stabilit că nu sînt diferenţe, între cei proveniţi din organele plantulelor apar deosebiri, în special la nivelul ARN-r.

Deosebirile care apar, de exemplu, între acizii nucleici din frunze, pe de o parte, şi cei din tulpini şi rădăcini, pe de altă parte, sînt, probabil, dependente de diferenţierea şi de funcţionarea cloroplastelor, ai căror

ARN-r se ştie că sînt diferiţi faţă de omologii lor mitocondriali şi citoplasmatici; această presupunere este întărită şi de rezultatele noastre privind eterogenitatea moleculară diferită a acizilor nucleici extraşi din organele plantulelor de mazăre crescute la întuneric şi în regim de lumină-întuneric (36).

Apar, de asemenea, deosebiri în acest sens între cotiledoanele plantulelor şi celelalte organe; spectrul electroforetic al acizilor nucleici din cotiledoanele plantulelor prezintă o imagine simplificată faţă de cel obţinut pentru acizii nucleici din frunze, tulpini şi rădăcini, chiar faţă de cel al cotiledoanelor din seminţele negerminate (35), (36). Acest fapt presupune o metabolizare şi, probabil, o vehiculare a acizilor nucleici sau a produşilor lor de degradare, în timpul germinării şi creşterii plantulelor, din cotiledoane către celelalte organe. De fapt, în timpul germinării seminţelor şi al creşterii plantulelor, după cum am arătat atît noi (37), cît şi alţi autori (G. Barker, Th. Douglas, Nature, **188**, 943 (1960)), activitatea RN-azelor se intensifică în cotiledoane.

Urmărind în paralel, pe acelaşi model experimental, activitatea RN-azelor (37), am arătat că între RN-azele conţinute în formaţiile seminţelor şi cele din organele plantulelor de mazăre se constată diferenţe privind atît pH-ul lor optim de acţiune şi activitatea manifestată la diferitele pH-uri optime, cît şi numărul, mobilitatea electroforetică şi mobilitatea fracţiunilor proteice RN-azice, separate în gelul de poliacrilamidă. Astfel, în urma germinării seminţelor, pH-ul optim (4,6) al RN-azelor din axul embrionar şi cotiledoane se schimbă, devenind 5,2 pentru toate organele plantulelor; totodată are loc o creştere marcantă a activităţii RN-azice în organele plantulelor la diferitele pH-uri optime stabilite şi o simplificare a spectrului electroforetic al RN-azelor din axul embrionar, însoţită de creşterea vitezei de migrare electroforetică a unor RN-aze, evidenţiate în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă.

Toate cele menţionate indică producerea unor modificări importante la nivelul RN-azelor în procesul germinării seminţelor şi al creşterii plantulelor de mazăre, modificări care ne preocupă în prezent în cercetările pe care le efectuăm.

Pe alte direcţii de cercetare, în domeniul acizilor nucleici s-a mai urmărit: influenţa exercitată de ARN exogen introdus în plante asupra acumulării proteinelor (448), introducerea şi translocarea ARN din *Saccharomices cerevisiae* şi a ADN din seminţele de tutun în plante de tomate (91), precum şi acţiunea ADN exogen extras şi purificat din unele specii de *Aspergillus* şi adăugat culturilor aceleiaşi specii sau ale unor specii diferite asupra biosintezei unor enzime, ca poligalacturonazele, amilazele şi proteazele (429), (430).

3. ACIZII NUCLEICI ŞI NUCLEAZELE DIN UNELE ŢESUTURI ANIMALE

Fără să ne oprim asupra unor cercetări efectuate în acest sens şi care au fost cuprinse într-un alt referat, ne vom referi doar la unele care au avut în vedere activitatea nucleazelor şi acizii nucleici din ţesutul muscular, unul dintre ţesuturile animale care au fost puţin studiate din

acest punct de vedere. Menţionăm totuşi în acest sens că în ultimii ani au apărut date în literatură care indică participarea posibilă a acizilor nucleici la activitatea musculară specifică.

Astfel, luînd în considerare posibilitatea intervenţiei acizilor nucleici, mai bine zis a produşilor lor de depolimerizare, la procesul de fosforilare oxidativă, s-a urmărit *in vitro* acţiunea ARN asupra nivelului fosfocreatinei în miotonia experimentală produsă de 2,4-D (acid 2,4-diclor-fenoxiacetic). S-a constatat în felul acesta că efectul de scădere a nivelului fosfocreatinei musculare produs de 2,4-D poate fi redus sau chiar anulat prin intervenţia ARN adăugat sistemului de reacţie (153).

S-a urmărit de asemenea activitatea RN-azelor din muşchiul sartorius de broască în stare normală şi în miotonie experimentală, constatîndu-se că sub acţiunea 2,4-D activitatea acestor enzime, în special la pH acid, creşte, efect care poate fi anihilat prin administrarea ionilor de Ca^{2+}, care manifestă o acţiune net inhibitoare asupra activităţii RN-azice a muşchiului miotonic (154). Folosind cromatografia pe DEAE-celuloză, au fost separate RN-azele de pH=4,0, 6,0 şi 7,0 din proteinele sarcoplasmatice extrase din muşchiul sartorius de broască (156).

În fine, un ultim aspect urmărit a fost acela al caracterizării din punct de vedere al conţinutului şi al eterogenităţii moleculare a acizilor nucleici din unii muşchi de broască diferiţi structural şi funcţional. S-a constatat în acest sens că între clasificarea histofiziologică a muşchilor şi distribuţia cantitativă şi calitativă a acizilor nucleici există o destul de strînsă corespondenţă (160).

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 409–415, (1972)

METODE ŞI TEHNICI DE CERCETARE ELABORATE ÎN INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

HORST D. SCHELL şi MIOARA CÂRSTEANU

Una dintre preocupările permanente ale cercetătorilor din Institutul de biochimie a fost aceea legată de elaborarea şi de introducerea de noi metode moderne de investigare specifice biochimiei, de adaptarea unor metode deja cunoscute la condiţiile cerute pentru rezolvarea unor probleme de cercetare mai speciale ivite pe parcurs şi de simplificarea anumitor metode de analiză în serie pentru a le face mai expeditive şi totodată mai accesibile şi laboratoarelor mai slab utilate. Corespunzător metodelor şi tehnicilor de cercetare atît de variate şi de numeroase folosite în diferitele ramuri ale biochimiei, au fost aduse în cursul anilor şi numeroase contribuţii practice şi rezolvări originale din partea cercetătorilor Institutului de biochimie.

O primă direcţie s-a îndreptat spre elaborarea unor metode adecvate pentru izolarea, purificarea şi studierea macromoleculelor biologice active, precum şi spre elaborarea de noi suporturi pentru electroforeză în gel, imunoelectroforeză, gelfiltrare şi cromatografie de schimb ionic.

Dintre realizările mai recente obţinute în acest domeniu putem aminti un dispozitiv pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă utilizate în analiza electroforetică a acizilor nucleici şi a proteinelor (431). Dispozitivul imaginat este deosebit de simplu şi uşor de confecţionat, iar migrarea electroforetică poate fi făcută pe plăcile obţinute în oricare aparat de electroforeză orizontală, existent de obicei în fiecare laborator axat pe analize biochimice. Dintre avantajele prezentate de dispozitivul descris mai putem aminti că el permite electroforeza simultană a unui număr de pînă la şase probe în paralel, obţinerea gelurilor de diferite concentraţii atît continue, cît şi discontinue, precum şi electroforeza în sistem continuu sau discontinuu prin posibilitatea de a varia concentraţia tampoanelor folosite la prepararea gelurilor şi la migrarea electroforetică. Acest nou sistem de turnare a plăcilor de poliacrilamidă este folosit în prezent în Institutul de biochimie la cercetarea eterogenităţii moleculelor acizilor nucleici din diferite materiale biologice.

Pornind de la acest dispozitiv, s-a elaborat totodată în cadrul laboratorului de acizi nucleici şi o nouă tehnică de evidenţiere a activităţii ribonucleazelor în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă. Această metodă constă, în principiu, în următoarele: extractele care conţin ribonucleaze sînt supuse mai întîi electroforezei în gel de poliacrilamidă, apoi se tratează gelul cu ARN şi se lasă la incubat un anumit timp în funcţie

de activitatea ribonucleazelor. ARN-ul nehidrolizat este în cele din urmă precipitat în gel şi colorat cu albastru de toluidină (436).

Dintre preocupările consacrate obţinerii unor suporturi adecvate pentru electroforeză în gel, imunoelectroforeză, gelfiltrare şi cromatografie în coloană de schimb ionic, cercetări stimulate mai ales datorită greutăţilor întîmpinate la procurarea din import şi preţului ridicat al unor astfel de produse, totuşi necesare, putem aminti punerea la punct a unui procedeu simplu şi rapid de preparare a agarozei din agar (137). Procedeul constă în îndepărtarea agaropectinei care însoţeşte agaroza în mod normal în agar prin precipitare cu clorură de cetil-piridiniu.

Datorită capacităţii sale de a forma geluri cu proprietăţi mecanice excelente, agaroza este folosită în prezent pe scară largă şi cu mult succes ca suport în electroforeză, imunoelectroforeză, imunodifuzie, gelfiltrare etc. (125), (136), (303).

Prin legarea încrucişată cu epiclorhidrină a moleculelor sale filiforme, formate din resturi alternante de D-galactoză şi 3,6-anhidro-L-galactoză, s-a obţinut o gamă de geluri cu proprietăţi de gelfiltrare similare gelurilor de tip Sephadex. Gelurile obţinute au fost folosite pînă în prezent cu rezultate bune la desalifierea soluţiilor proteice, la purificarea proteinelor şi anticorpilor fluorocromaţi şi la separarea lizozimului de albumina serică umană (344).

Prin introducerea de funcţiuni capabile de schimb ionic în molecula agarozei simple sau a agarozei legate încrucişat, s-au obţinut o serie de schimbători de ioni noi, acizi şi bazici, de tărie diferită — slabă, medie şi puternică—, cum sînt: carboximetil (CM)-, fosfat (P)-, sulfoetil (SE)-, dietilaminoetil (DEAE)-, trietilamoniuetil (TEAE)-şi ECTEOLA-agaroza (139), (347).

Schimbătorii de ioni obţinuţi posedă capacităţi de rezoluţie similare sau superioare celor de tipul celulozei sau al dextranului. Cu aceşti produşi se poate realiza, în plus, o tehnică nouă de electroforeză, şi anume electroforeza şi imunoelectroforeza în geluri schimbătoare de ioni, la care efectul electroforetic este combinat cu cel cromatografic, de schimb ionic. Cu ajutorul acestei tehnici s-au putut fracţiona o serie de proteine care apar omogene la analiza electroforetică în geluri neîncărcate electric (140), (343), (470).

Dacă aceste geluri schimbătoare de ioni sînt folosite însă ca suport în cromatografia în coloană, de data aceasta are loc o combinare a efectului de cernere moleculară cu cel de schimb ionic (144), (341), (345), (348). Produşii realizaţi au fost şi sînt folosiţi cu succes la separarea electroforetică, cromatografică şi imunochimică a proteinelor serice, musculare, cerebrale, colostrale, imunoglobulinelor şi altora.

Unii dintre produşii sintetizaţi au servit de asemenea şi la prepararea unor imunosorbenţi cu capacitate mare de fixare a anticorpilor şi adsorbţie nespecifică neglijabilă (141), (142).

A fost elaborat totodată şi un procedeu de trecere în stare uscată a gelurilor granulate sau perlate ale schimbătorilor de ioni şi ale imunosorbenţilor pe bază de agaroză, precum şi a gelurilor perlate ale agarozei ca atare, cu păstrarea proprietăţilor lor fizicochimice, imunologice şi mecanice în urma reimbibiţiei (143), (346). Procedeul elaborat şi brevetat (507) prezintă avantajul că preparatele obţinute pot fi păstrate şi livrate în stare uscată,

fără pericol de alterare ireversibilă prin îngheţ sau prin atac de microorganisme în absenţa antisepticilor, aşa cum este cazul în prezent, de pildă, la unele geluri asemănătoare din comerţ livrate sub formă de suspensii de geluri granulate sau perlate cu un conţinut ridicat în apă, de peste 90%.

Cercetările efectuate în domeniul agarozei au format obiectul a şapte patente, brevetate în ţară şi străinătate (500—(502), (504) — (507).

Dintre metodele şi tehnicile care se încadrează în această primă direcţie mai pot fi citate:

— metoda de imunoelectroforeză care întrebuinţează antigene fluorescente şi care permite identificarea principalelor tipuri de anticorpi dintr-un ser imun şi detectarea complexelor imune solubile; metoda este cunoscută sub numele de fluoroimunoelectroforeză (105);

— metoda imunocromatografică în strat subţire, care permite analiza amestecurilor proteice antigenice după greutatea lor moleculară (81);

— metoda de dozare şi de purificare a anticorpilor cu ajutorul unor imunosorbenţi preparaţi prin legarea chimică a antigenelor de suporturi insolubile pe bază de celuloză şi agaroză (141), (142);

— imunoelectrocromatografia în strat subţire (82);

— detectarea prin imunodifuzie a proteinelor separate prin cromatografie în strat subţire (125) şi altele.

A fost descrisă o tehnică nouă şi interesantă, denumită histocromatografie în strat subţire, cu aplicaţii în domeniul biochimiei, şi anume în cercetări de histotopochimie a lipidelor intracelulare simple şi complexe (78), (80). Această metodă constă, în principiu, în extracţia şi etalonarea concomitentă a lipidelor, respectiv fosfolipidelor dintr-o secţiune histologică, în cazul unei migrări cromatografice pe un strat subţire de kieselgel. Importanţa metodei constă în posibilitatea de a corela rezultatele analizei biochimice cu controlul microscopic al secţiunii histologice. Acest procedeu a fost aplicat la cercetări privind citoarhitectura diferitelor straturi ale ţesutului cerebral, diferenţierea unor tipuri de tumori, compoziţia fosfolipidică a diferitelor ţesuturi, a mitocondriilor etc.

În directă legătură cu acest procedeu s-au realizat două inovaţii: una privind o metodă modificată pentru histocromatografia în strat subţire şi a doua privind realizarea unui sistem simplu şi accesibil de efectuare a cromatografiei pe cromatoplăci de tip Kodak (508), (509). Prima adaptare se referă la realizarea în condiţii optime a cromatografiei în strat subţire a secţiunilor tisulare şi înlătură o serie de inconveniente ale metodei histocromatografice folosite în prezent. Modificările prezentate au avantajul că permit realizarea printr-o singură operaţie a unui strat de kieselgel omogen, uniform, continuu şi de grosime dorită pe placa cromatografică şi evită folosirea diverselor soluţii adezive pentru fixarea lamelelor, anulînd repercusiunile negative ale acestora asupra calităţii cromatogramei prin dizolvarea lor parţială în solvenţii organici folosiţi. A doua adaptare se referă la un dispozitiv care permite efectuarea cromatografiei în strat subţire pe cromatoplăci de tip Kodak-Easton fără folosirea casetei speciale, destul de costisitoare, livrată de firme străine de specialitate. Sistemul propus mai prezintă avantajul că asigură menţinerea condiţiilor optime de lucru în timpul cromatografiei, economiseşte cromatoplăci, evită folosirea materialelor plastice sau a celor de răşini care ar putea fi atacate de

sistemul de solvenţi organici şi, fiind simplu de confecţionat, este accesibil tuturor laboratoarelor interesate în această metodă.

O altă grupă de metode şi tehnici noi elaborate la Institutul de biochimie şi aplicate atît în institut cît şi în alte unităţi de cercetare au fost imaginate pentru a uşura cercetarea anumitor aspecte ale biochimismului specific plantelor.

Printre aceste metode putem aminti, printre altele, aşa-numita „metodă a despicării" (32), (203), care permite cercetări biochimice comparative la plante. Este cunoscut faptul că cercetările în domeniul biochimiei plantelor întîmpină anumite dificultăţi atunci cînd indicii biochimici variază mult de la o plantă la alta. În asemenea cazuri se impune executarea cercetărilor pe un număr mare de plante şi folosirea calculului statistic pentru interpretarea rezultatelor experimentale.

Acest inconvenient este înlăturat prin folosirea metodei despicării, care constă în secţionarea longitudinală în două a tulpinii pînă la rădăcină şi reunirea celor două jumătăţi după intercalarea unei fîşii subţiri din material impermeabil. Plantele astfel prelucrate continuă să trăiască timp îndelungat, iar cele două jumătăţi ale lor pot fi folosite una pentru experimentare şi cealaltă drept martor, dat fiind că părţile simetrice ale plantelor prezintă de obicei o compoziţie şi o comportare biochimică asemănătoare. Procedeul acesta se apropie de cel folosit curent în cercetarea biochimismului muscular, cînd la acelaşi animal unul dintre muşchii simetrici este supus experimentării, pe cînd celălalt serveşte drept martor.

„Metoda capilară" este o altă metodă elaborată în Institutul de biochimie (170), (171,) (463), care oferă posibilităţi multiple şi interesante pentru rezolvarea diferitelor probleme în domeniul biochimiei şi fiziologiei plantelor. Permiţînd o urmărire exactă atît a cantităţii substanţelor care intră în plante, cît şi a vitezei lor de pătrundere, metoda se pretează în mod deosebit la colchinizare, la tratamentul cu hormoni de creştere, la hibridare vegetativă, la combaterea bolilor, la protecţia faţă de dăunători etc.

În vederea cercetării evoluţiei proceselor biochimice în seminţele plantelor de cultură în cursul germinării, iarovizării şi stimulării, s-a recurs şi la folosirea fenomenului de exosmoză (167). Această metodă prezintă interese mai ales prin faptul că cercetarea exosmozei se face pe materialul vegetal viu în condiţii de păstrare intactă a structurii sale morfologice. Ea permite caracterizarea activităţii unor enzime prin determinarea raportului dintre intensităţile proceselor de hidroliză şi sinteză. Datele experimentale obţinute prin această metodă la diferitele aplicaţii practice au fost prezentate deja într-un referat anterior. Ar fi de amintit cu această ocazie doar faptul că în cadrul stimulării seminţelor plantelor de cultură s-a procedat pentru prima oară şi la oprirea fenomenului de exosmoză prin introducerea în mediul de exosmoză a unor cantităţi corespunzătoare de „opritori ai exosmozei".

Menţionăm de asemenea că sub acţiunea unor substanţe chimice propuse de Institutul de biochimie ca stimulatori ai seminţelor de legume s-a reuşit să se realizeze sporuri de recoltă de pînă la 110%, de pildă în cazul tomatelor, ceea ce poate constitui sursa unor importante beneficii pentru unităţile legumicole. Procedeul aplicat a accelerat de asemenea ritmul de creştere al plantelor şi a mărit considerabil conţinutul în

vitamina C, care a prezentat creşteri cuprinse între 118 şi 148%, determinînd o îmbunătăţire a valorii nutritive, mai ales a tomatelor (31).

În directă legătură cu aceste cercetări amintite mai sus, s-a elaborat o metodă de dozare polarografică a vitaminei C din legume (403). S-a stabilit cu această ocazie că folosirea acidului metafosforic ca mediu de extracţie şi a tamponului de fosfaţi ca soluţie de bază conduce la rezultate optime în cazul determinării polarografice a conţinutului în vitamina C la diferite legume. Putem aminti în acest loc şi metoda polarografică originală de determinare potenţiometrică a pH-ului (229). Această metodă, sensibilă şi aplicabilă pentru întregul domeniu de pH cuprins între 1 şi 14, prezintă interes prin faptul că poate fi folosită şi în cazul soluţiilor netamponate, dar mai ales prin faptul că permite înregistrarea automată a rezultatului, care poate servi apoi ulterior direct ca document.

Dintre tehnicile interesante şi deosebit de utile în domeniul biochimiei plantelor elaborate la Institutul de biochimie, mai poate fi amintită cea de obţinere a sucului plasmatic din seminţe (117) şi cea de blocare a reacţiei de brunificare a sucului celular (112). Aceasta din urmă constă în introducerea prin vacuuminfiltraţie a unei soluţii de sulfit şi disulfit de sodiu în frunzele plantei de cercetat. Sucurile obţinute în aceste condiţii au o culoare galbenă deschis, datorită inhibării sistemelor enzimatice şi neenzimatice care produc brunificarea sucului celular, iar proteinele cuprinse în ele se apropie de starea lor nativă.

Alt domeniu cercetat în cadrul Institutului de biochimie în decursul anilor a fost cel legat de permeabilitatea membranelor lichide (161). Pentru cercetarea permeabilităţii acestor membrane care se formează la suprafaţa separaţiei dintre două lichide nemiscibile a fost elaborată o metodă simplă şi comodă, denumită „metoda picăturilor" (166). Avantajul ei constă în faptul că aparatura folosită este extrem de simplă şi poate fi realizată în orice laborator.

În decursul anilor, pe lîngă elaborarea unor metode originale de investigare, au fost aduse şi o serie de modificări ale unor metode deja cunoscute, fie pentru simplificarea lor, fie pentru adaptarea lor la necesităţile ivite în rezolvarea diferitelor aspecte de cercetare mai deosebite. Astfel putem aminti o simplificare a metodei Thunberg pentru determinarea activităţii dehidrazelor (227). Prin folosirea unor tuburi de reacţie mult simplificate, evacuarea aerului din interiorul lor nu mai este necesară, oxigenul fiind absorbit de o soluţie alcalină de pirogalol. Metoda poate fi folosită şi în laboratoarele mai slab utilate, fără instalaţii de vidare. Tot pentru evitarea folosirii vidului a fost modificată şi simplificată metoda Bertrand pentru dozarea zaharurilor reducătoare (244). Metoda modificată lucrează în prezenţa bicarbonatului de sodiu şi a sulfatului de zinc. Bicarbonatul permite folosirea la filtrarea oxidului cuprос a hîrtiei de filtru simple, care, în aceste condiţii, nu mai reţine ionii de cupru, iar sulfatul de zinc protejează oxidul cupros contra acţiunii directe a aerului, înglobîndu-l într-un precipitat uşor filtrabil.

O simplificare şi adaptare au fost aduse şi tehnicii lui Jendrassik şi Faiszt de fixare a compuşilor macroergici la studiul fosfatului anorganic liber din muşchi (350). Prin modificări aduse acestei tehnici, ea a devenit aplicabilă şi la dozările de fosfor anorganic liber din muşchii excitaţi, unde modificările metabolice petrecute sînt imediate şi reversibile.

O altă adaptare a fost necesară şi în cazul micrometodei de dozare a proteinelor după Lowry, modificată de Miller, pentru a putea fi aplicată la determinarea fracţiunilor proteice eluate dintr-o coloană cromatografică prin gradient de concentraţie în clorură de potasiu (411). S-a constatat că clorura de potasiu, chiar în concentraţii foarte mici ($\geqslant$70 mM), face inaplicabilă această metodă prin formarea unei combinaţii insolubile în prezenţa reactivului fosfomolibdenowolframic. Prin înlocuirea sării de potasiu cu una de sodiu, metoda devine aplicabilă.

O adaptare interesantă a fost adusă metodei clasice de electroforeză în gel de poliacrilamidă a lui Davies (420). Astfel, standardizîndu-se condiţiile de electroforeză verticală în gel de poliacrilamidă, s-au stabilit condiţiile optime pentru extracţia proteinelor din diverse organe pentru sisteme de tampon şi pH, concentraţiile gelului şi localizarea activităţii unor enzime pe electroforegrame.

Rezultate fructuoase au fost obţinute şi prin utilizarea în cadrul cercetărilor de biochimie musculară a modelului experimental al perfuziei muşchilor striaţi (259). Dintre avantajele pe care metoda perfuziei le oferă pot fi enumerate : păstrarea integrităţii ţesutului pe care se lucrează, introducerea pe cale firească, circulatorie a anumitor substanţe capabile să reacţioneze asupra metabolismului muscular, dozarea componentelor chimice antrenate de lichidul de perfuzie, efectuarea cu uşurinţă a stimulărilor electrice ale muşchilor şi înregistrarea simultană a contracţiilor. Amintim totodată că pînă în prezent majoritatea cercetărilor de biochimie musculară au fost efectuate pe muşchi izolat, care este adesea impropriu pentru urmărirea unor aspecte speciale ale metabolismului muscular. Metoda perfuziei a fost aplicată în Institutul de biochimie şi în cazul altor organe, ca intestin, ficat, rinichi şi plămîni (128).

Au fost de asemenea stabilite condiţiile pentru localizarea fracţiunilor catalazice pe proteinograme obţinute pe gel de agar (19).

În cadrul institutului au fost elaborate şi unele metode noi de diagnostic biochimic, dintre care amintim : urmărirea variaţiei în timp a vscozităţii serului sangvin sub acţiunea clorurii mercurice în vederea diagnosticării cancerului (246), folosirea acidului sulfosalicilic (222) sau a verdelui acid într-o soluţie de alcool amilic saturat în apă în vederea diagnosticării cancerului şi a altor maladii, apoi aplicarea reacţiei vîscozimetrice la testele de disproteinemii (275) sau elaborarea unei electrode pentru determinarea rapidă şi simplă a pH-ului vaginal *in situ* (237).

În cadrul acestor metode poate fi enumerată şi cea de determinare a exosmozei electroliţilor din colul uterin (206). Metoda permite investigarea rapidă şi comodă a exocolului uterin *in situ*, cu păstrarea condiţiilor lui de structură intactă, şi prezintă interesu pentru diagnosticul precoce şi urmărirea evoluţiei diferitelor maladii ale acestuia. Metoda se bazează pe exosmoza din colul uterin a electroliţilor în apă distilată, cunoscut fiind faptul că modificările permeabilităţii şi echilibrului electroliţilor din ţesut, frecvente în diferite stări patologice ale colului uterin, sînt însoţite de modificări ale exosmozei. Această metodă a fost adaptată şi folosită de asemenea la studiul şi la diagnosticarea unor boli de piele (52), (53), (55).

În sfîrşit, mai amintim faptul că pentru a pune la dispoziţia zootehnicienilor o metodă simplă şi rapidă de obţinere a unui preparat hialuro-

nidazic utilizabil pentru fecundaţii artificiale, a fost pusă la punct o metodă de preparare a acestui ferment sub formă de praf direct din spermă, mai bogat în hialuronidază, şi nu din extracte testiculare. Produsul obţinut rămîne activ 60 de zile de la preparare dacă este păstrat la întuneric şi la rece, iar adăugat la sperma proaspătă nu este nociv pentru spermatozoizi (204).

În concluzie, se poate afirma că cercetătorii Institutului de biochimie, prin activitatea lor ştiinţifică desfăşurată în cursul anilor, au îmbogăţit metodologia şi tehnica de cercetare specifică atît biochimiei, cît şi altor ramuri înrudite prin numeroase contribuţii originale valoroase, care şi-au găsit concretizarea în numeroase lucrări ştiinţifice şi în nouă inovaţii şi opt invenţii, brevetate în ţară şi în străinătate.

Prezentat la redacţie la 25 iulie 1972

Institutul de biochimie,
Bucureşti

OSZTÁGOSMŰSZAKIKÖNYVTÁRÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1893

F 1330

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 417–438 (1972)

MAGYAR GYÓGYSZERÉSZEK EGYESÜLETE 1893

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE DE CADRELE INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE ÎN PERIOADA 1952—1972

I. STUDII

1. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Exosmoza și activitatea catalazei în cursul iarovizării semințelor grîului de toamnă.* St. cerc. biochim., *3*, 45 (1960).
2. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Degradarea tributirinei și a uleiului de floarea-soarelui de către lipaza pancreatică în prezența mucusului biliar.* St. cerc. biochim., *3*, 39 (1960); Rev. chim. Acad. R.P.R., *6*, 137 (1961).
3. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Aspecte ale biochimismului semințelor de grîu, porumb și bumbac, stimulate cu bromură de potasiu, hidrochinonă și acid glutamic.* St. cerc. biochim., *3*, 171 (1960).
4. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb.* St. cerc. biochim., *5*, 7 (1962).
5. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb în timpul încolțirii.* St. cerc. biochim., *5*, 399 (1962).
6. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din germenii diferitelor soiuri de porumb.* St. cerc. biochim., *7*, 347 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 275 (1964).
7. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din frunzele de porumb.* St. cerc. biochim., *8*, 151 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 115 (1965).
8. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Comportarea electroforetică și imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germeni și endospermi de porumb.* St. cerc. biochim., *10*, 301 (1967).
9. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Raportul antigenic dintre proteinele solubile din axul embrionar al seminței și alte formațiuni și organe ale porumbului.* St. cerc. biochim., *11*, 233 (1968).
10. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Raportul antigenic dintre proteinele solubile din endospermul, scutelul seminței și alte formațiuni și organe ale porumbului.* St. cerc. biochim., *11*, 349 (1968).
11. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Wheat catalase isoenzymes during the first growing stages.* Rev. roum. Biochim., *7*, 187 (1970).
12. ALEXANDRESCU VICTORIA, *Izoenzimele catalazei din porumb în primele etape de creștere.* St. cerc. biochim., *13*, 233 (1970).
13. ALEXANDRESCU VICTORIA, IOANA CĂLIN, *Comportarea electroforetică și imunoelectroforetică a proteinelor din axul embrionar al seminței de porumb după germinație.* St. cerc. biochim., *11*, 239 (1968).
14. ALEXANDRESCU VICTORIA, IOANA CĂLIN, *Electroforeza și imunoelectroforeza proteinelor din endospermul și scutelul seminței germinate și raporturile antigenice cu alte formațiuni și organe ale porumbului.* St. cerc. biochim., *11*, 355 (1968).
15. ALEXANDRESCU VICTORIA, IOANA CĂLIN, *Electrophoretic and immunoelectrophoretic study of maize isoperoxidases.* Rev. roum. Biochim., *6*, 171 (1969).
16. ALEXANDRESCU VICTORIA, IOANA CĂLIN, *Electroforeza și imunoelectroforeza proteinelor din frunzele de porumb și de alte cereale.* St. cerc. biochim., *12*, 127 (1969).
17. ALEXANDRESCU VICTORIA, IOANA CĂLIN, *Studiu electroforetic și imunoelectroforetic al izoperoxidazelor din frunzele de grîu, orz, ovăz, secară și din rădăcină de hrean.* St. cerc. biochim., *12*, 223 (1969).

18. ALEXANDRESCU VICTORIA, IOANA HAGIMA-CĂLIN, *Peroxidaza din grîu în primele etape de creştere.* St. cerc. biochim., *13*, 113 (1970).
19. ALEXANDRESCU VICTORIA, F. MIHĂILESCU, *Realizarea unei enzimoproteinograme pentru catalază.* St. cerc. biochim., *11*, 187 (1968).
20. ALEXANDRESCU VICTORIA, F. MIHĂILESCU, *Les proteines solubles et les isoenzymes de la catalase et de la peroxydase de la gemmule avec la radicule du cotylédon et de l'endosperme du grain de maïs.* Rev. roum. Biochim., *5*, 189 (1968).
21. ALEXANDRESCU VICTORIA, F. MIHĂILESCU, *Studiul electroforetic al amilazelor porumbului în primele etape de creştere.* St. cerc. biochim., *12*, 315 (1969).
22. ALEXANDRESCU VICTORIA, F. MIHĂILESCU, *Electrophoretic study of wheat amylases during the first growing stages.* Rev. roum. Biochim., *7*, 3 (1970).
23. ALEXANDRESCU VICTORIA, DOINA POPOV, *Isoenzymes de la catalase et de la peroxydase et analyse par electrophorèse des protéines solubles de certaines formations souscellulaires des feuilles de maïs.* Rev. roum. Biochim., *5*, 97 (1968).
24. ALEXANDRESCU VICTORIA, DOINA POPOV, *Acţiunea diverşilor ioni asupra activităţii fosfatazei acide din porumb.* St. cerc. biochim., *12*, 121 (1969).
25. ALEXANDRESCU VICTORIA, DOINA POPOV, *Electrophoretic separation of maize acid isophosphatases.* Rev. roum. Biochim., *6*, 105 (1969).
26. ALEXANDRESCU VICTORIA, DOINA POPOV, *The acid phosphatase and the inorganic phosphate of wheat in the first growth phases.* Rev. roum. Biochim., *7*, 85 (1970).
27. ALEXANDRESCU VICTORIA, I. SUTKA, IOANA HAGIMA-CĂLIN, DOINA POPOV, F. MIHĂILESCU, *Formele moleculare ale unor enzime din seminţele unei linii de porumb şi din mutanţii obţinuţi prin iradierea cu neutroni.* St. cerc. biochim., *14*, 263 (1971).
28. ARNET LIA, *Formarea şi comportarea coacervatului gelatină-gumă arabică în prezenţa hemoglobinei, ovalbuminei şi serumalbuminei.* St. cerc. biochim., *1*, 363 (1958).
29. ARNET LIA, *Inhibarea prin uree a peroxidazei din frunzele de porumb şi efectul protector al ionilor de cupru.* St. cerc. biochim., *5*, 17 (1962).
30. ARNET LIA, DITA COTARIU, *Degradarea amidonului şi a cazeinei în prezenţa mucusului biliar.* St. cerc. biochim., *3*, 59 (1960); Rev. Chim. Acad. R.P.R., *6*, 215 (1961).
31. BĂLAN D., M. ŞERBAN, *Sporirea producţiei de tomate prin tratare cu stimulenţi chimici.* Com. Acad. R.P.R., *12*, 1053 (1957).
32. BOTOŞENEANU LILICA, *Despicarea totală a plantelor pentru cercetări biochimice comparative.* St. cerc. biochim., *8*, 335 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 279 (1965).
33. BOTOŞENEANU LILICA, *Izoperoxidazele din mazăre* (Pisum sativum) *în cursul germinaţiei.* St. cerc. biochim., *11*, 247 (1968).
34. BOTOŞENEANU LILICA, *Influenţa glucozei şi a zaharozei exogene asupra valorilor azotului proteic şi azotului total din* Solanum lycopersicum. St. cerc. biochim., *11*, 111 (1968).
35. BOTOŞENEANU LILICA, S. S. VASU, *Acides nucléiques des formations des graines de pois* (Pisum sativum) *avant et après la germination.* Rev. roum. Biochim., *6*, 263 (1969).
36. BOTOŞENEANU LILICA, S. S. VASU, *Acizii nucleici din plantulele de mazăre* (Pisum sativum) *crescute la întuneric şi în regim de lumină-întuneric.* St. cerc. biochim., *14*, 5 (1971).
37. BOTOŞENEANU LILICA, S. S. VASU, *Ribonucleazele din formaţiunile seminţelor şi organelor plantulelor de mazăre* (Pisum sativum). St. cerc. biochim., *15*, 9 (1972).
38. BUZILĂ LUCIA, *The immunochemical study of pea cryoproteins* (Pisum sativum), în *Mechanism of mutation and inducing factors*, ed. by Z. Landa, Praga, 1966, p. 505.
39. BUZILĂ LUCIA, *Purificarea crioproteinei din mazăre* (Pisum sativum) *sub control imunochimic.* St. cerc. biochim., *9*, 21 (1966).
40. BUZILĂ LUCIA, *Physico-chemical and immunochemical correspondences between the cryoprotein and vicilin of pea seeds* (Pisum sativum). Rev. roum. Biochim., *4*, 103 (1967).
41. BUZILĂ LUCIA, *Anticorpi anti-DANS şi interacţiunea lor cu haptena fluorescentă.* St. cerc. biochim., *11*, 121 (1968).
42. BUZILĂ LUCIA, *Scindarea vicilinei din sămînţa de mazăre* (Pisum sativum) *în timpul germinaţiei.* St. cerc. biochim., *12*, 229 (1969).
43. BUZILĂ LUCIA, *Modificări moleculare ale vicilinei rămasă nehidrolizată în cursul germinaţiei seminţelor de mazăre* (Pisum sativum). St. cerc. biochim., *12*, 327 (1969).

44. BUZILĂ LUCIA, *Răspunsul în anticorpi al iepurilor imunizați cu albumină serică umană după o dietă colesterolică.* St. cerc. biochim., *14*, 13 (1971).
45. BUZILĂ LUCIA, V. GHEȚIE. *Recherches immunoélectrophorétiques sur la distribution des sites de combinaison entre les sousunités des anticorps.* Rev. roum. Biochim., *6*, 183 (1969).
46. BUZILĂ LUCIA, DOINA ONICĂ, V. GHEȚIE, *Resorbția și persistența în circulație a serum-globulinei administrate intramuscular la iepure.* St. cerc. Biochim., *14*, 135 (1971).
47. CATRINA I., H. D. SCHELL, CORINA IORDACHE, CORNELIA NIȚU, *Cercetări fiziologice și biochimice în fenomenul de uscare a stejarului.* St. cerc. biochim., *5*, 25 (1962); Biul. Nauk. Inf. Estestvenn. Nauk, *2*, 138 (1962).
48. CÂRSTEANU MIOARA, *Acțiunea lecitinei asupra membranei lichide alcool izoamilic-apă pentru veronal.* St. cerc. biochim., *1*, 355 (1958).
49. CÂRSTEANU MIOARA, *Influența coacervatului ser-gumă arabică asupra activității catalazei hepatice de cal și a catalazei extrase din grîu.* St. cerc. biochim., *5*, 39 (1962).
50. CÂRSTEANU MIOARA, *Influența hiperemiei experimentale, timpului și temperaturii asupra exosmozei electroliților din pielea umană normală.* St. cerc. biochim.,*6*, 255 (1963); Die Haut als Spiegel des Organismus. Berlin, Grosse Verlag, 1971, p. 718.
51. CÂRSTEANU MIOARA, *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din pielea umană normală.* St. cerc. biochim., *8*, 177 (1965).
52. CÂRSTEANU MIOARA, *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din pielea umană în diferite stări patologice.* St. cerc. biochim., *9*, 262 (1966).
53. CÂRSTEANU MIOARA, *Acțiunea corticoterapiei generale asupra exosmozei sodiului, potasiului și calciului din pielea umană în diferite stări patologice.* St. cerc. biochim., *10*, 99 (1967).
54. CÂRSTEANU MIOARA, *Exosmoza aminoacizilor liberi din pielea vertebratelor în scară filogenetică.* St. cerc. biochim., *13*, 31 (1970).
55. CÂRSTEANU MIOARA, *Influența vitaminei B_{12} asupra exosmozei electroliților din piele în vitiligo și psoriazis.* St. cerc. biochim., *13*, 243 (1970).
56. CÂRSTEANU MIOARA, *Unele aspecte ale biochimismului pielii la diferite vertebrate.* St. cerc. biochim., *14*, 361 (1971).
57. CÂRSTEANU MIOARA, R. DUMITRIU, *Exosmosis of free amino acids from human skin in sclerodermia and lupus erythematosus.* Rev. roum. Biochim., *7*, 91 (1970).
58. CÂRSTEANU MIOARA, R. DUMITRIU, *Some aspects of collagen metabolism in human skin with sclerodermia and lupus erythematosus.* Rev. roum. Biochim., *8*, 197 (1971).
59. CÂRSTEANU MIOARA, R. DUMITRIU, *Some aspects of amino acids metabolism from human skin in psoriasis.* Rev. roum. Biochim., *9*, Nr. 3, (1972).
60. CÂRSTEANU MIOARA, ALEXANDRINA POPESCU, *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din exocolul uterin normal și patologic.* St. cerc. biochim., *10*, 199 (1967).
61. CILIEVICI DOINA, *Electrophoretic heterogeneity of the light chains of rabbit antibodies during the primary response.* Rev. roum Biochim., *6*, 283 (1969).
62. CONSTANTINESCU C., C. VIOR, CORINA SARMANIOTI, M. PETROVSKI, *Localizarea activității antitoxice în imunoglobulinele izolate din serul hiperimun anti-beta perfringens* (Walahia agni, *tip B*). St. cerc. biochim., *15*, 145 (1972).
63. CORNOIU IRINA, *Ionii de potasiu, calciu și sodiu în sucurile frunzelor stimulate electric.* St. cerc. biochim., *14*, 17 (1971).
64. CORNOIU IRINA, *Aminoacizii din biostructura frunzelor de grîu.* St. cerc. biochim., *14*, 367 (1971).
65. CORNOIU IRINA, *Eliberarea aminoacizilor din biostructura frunzelor de grîu sub acțiunea azidei de sodiu.* St. cerc. biochim., *15*, 21 (1972).
66. COTARIU DITA, *Hidroliza triptică a proteinelor acvosolubile din creier.* St. cerc. biochim., *5*, 263 (1962).
67. COTARIU DITA, *Izoenzimele izocitratdehidrogenazei și glutamat dehidrogenazei din mușchii striați, în seria vertebratelor.* St. cerc. biochim., *13*, 347 (1970).
68. COTARIU DITA, *Biochimia comparată a unor izoenzime musculare.* St. cerc. biol., seria Zool., *23*, 47 (1971).
69. COTARIU DITA, *Efectul pH-ului, al temperaturii și al ureei asupra activității malat-dehidrogenazelor din mușchii striați la diferite vertebrate.* St. cerc. biol., seria Zool., *23*, 249 (1971).

70. COTARIU DITA, TR. RĂDULESCU, *Deplasarea potasiului și sodiului din mușchiul striat de broască în contracție liberă și contracție cu travaliu mecanic.* St. cerc. biochim., *9*, 277 (1966).
71. COTARIU DITA, TR. RĂDULESCU, *Distribuția sodiului între compartimentele intracelular și extracelular ale mușchiului gastrocnemian de broască denervat.* St. cerc. biochim., *10*, 111 (1967).
72. COTARIU DITA, M. ȘERBAN, *Fosfolipidele din mușchiul scheletic de broască în diferite stări funcționale.* St. cerc. biochim., *10*, 307 (1967).
73. COTARIU DITA, M. ȘERBAN, *Comparative biochemistry of isoenzymes. III. Brain and muscle aldolase isoenzymes in the phylogeny of vertebrates.* Rev. roum. Biochim., *6*, 11 (1969).
74. COTARIU DITA, M. ȘERBAN, *Efectul corticosteroizilor auspra izoenzimelor lacticodehidrogenazei, malicodehidrogenazei și aldolazei din mușchiul striat.* St. cerc. biochim., *12*, 35 (1969).
75. COTARIU DITA, M. ȘERBAN, *Izoenzimele izocitrat dehidrogenazei și glutamat dehidrogenazei din mușchiul neted la diferite vertebrate.* St. cerc. biol., seria Zool., *23*, 169 (1971).
76. COTARIU DITA, M. ȘERBAN, *The effect of oxaloacetate and malate concentrations upon malate dehidrogenase activity in striated and smooth muscles in the phylogeny of vertebrates.* Rev. roum. Biochim., *9* (1972).
77. COTARIU DITA, M. ȘERBAN, *Contributions to the biochemical study of white and red muscles.* Rev. roum. Biochim., *9*, 15 (1972).
78. CURRI S. B., M. ȘERBAN, *The histochromatography and one modification of this procedure.* La Ricerca Scientifica (Roma), *36*, 748 (1966).
79. CURRI S. B., M. ȘERBAN. *Identification of free and bound aminoacids in proteolipids extracted from the hypothalamus.* La Ricerca Scientifica (Roma), *36*, 753 (1966).
80. CURRI S. B., M. ȘERBAN, *L'application de la méthode chromatographique en couche mince à l'histotopochimie des lipides : l'histochromatographie.* Rev. roum. Biochim., *4*, 3 (1967).
81. DRAGOMIRESCU CORINA, *Determinarea greutății moleculare a lanțurilor polipeptidice L și H din molecula de IgG de iepure prin cromatografia în strat subțire pe gel de Sephades G-200.* St. cerc. biochim., *10*, 129 (1967).
82. DRAGOMIRESCU CORINA, *Imunoelectrocromatografia în strat subțire.* Doc. Haemat. *2*, 35 (1968).
83. DRAGOMIRESCU CORINA, *Hidroliza triptică a IgG de iepure fluorescentă, denaturată prin căldură.* St. cerc. biochim., *11*, 141 (1968).
84. DRAGOMIRESCU CORINA, *Cercetări imunoelectroforetice asupra unor fragmente eliberate din regiunea Fc prin hidroliza imunoglobulinei G de iepure cu papaină și pepsină.* St. cerc. biochim., *13*, 257 (1970).
85. DUMITRIU R., MIOARA CÂRSTEANU, *Exosmoza electroliților din pielea aparent sănătoasă a bolnavilor cu dermatoze alergice profesionale.* Fiziol. norm. patol., *1*, 57 (1967).
86. DUMITRIU R., MIOARA CÂRSTEANU, *The exosmosis of free aminoacids from normal human skin.* Rev. roum. Biochim., *5*, 107 (1968).
87. ELEFTERESCU VIORICA, *Eliberarea treptată a apei și a altor substanțe din biostructura frunzelor de porumb sub acțiunea azidei de sodiu.* St. cerc. biochim., *13*, 261 (1970).
88. ELEFTERESCU VIORICA, *Eliberarea apei, substanțelor hidrosolubile, ionilor de potasiu și calciu și a ribonucleazelor din biostructura frunzelor de porumb sub acțiunea cloramfenicolului și a arsenitului de sodiu.* St. cerc. biochim., *14*, 269 (1971).
89. FRUNZETI VIORICA, *Some biochemical aspects of seed and plant stimulation.* Proc. Internat. Symp. Plant. Stimul, Sofia, 1966, p. 1051.
90. FRUNZETI VIORICA, *Introducerea și translocarea acidului ribonucleic din* Saccharomyces cerevisiae *și a acidului dezoxiribonucleic din semințe de tutun BEL 61—10 în plante de tomate.* St. cerc. biochim., *9*, 167 (1966); Rev. roum. Biochim., *4*, 31 (1967).
91. FRUNZETI VIORICA, LILICA BOTOȘENEANU, SANDA RĂDULESCU, *Acțiunea dihidrofoliculinei și testosteronei asupra catalazei foliare și a consumului de oxigen la tulpinile de* Solanum lycopersicum *și* Anthirrinum majus. St. cerc. biochim., *4*, 357 (1961).
92. FRUNZETI VIORICA, LUCIA BUZILĂ, ELENA GHINEA, *Introducerea soluțiilor în plante prin metoda capilară.* St. cerc. biochim., *2*, 285 (1959).

93. GHEORGHE S. D., *Homoneurinele cocainei, codeinei, nicotinei şi papaverinei.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 821 (1955).
94. GHEORGHE S. D., H. D. SCHELL, *Curarewirskame bis-quaternäre Ammoniumsalze mit Amidfunktionen. I. Bisoniumacetylderivate des o-, m- und p-Phenylen-diamins, Benzidins und o-Dianisidins.* Rev. Chim. Acad. R.P.R., *2*, 317 (1957); St. cerc. biochim, *1*, 247 (1958); Com. Acad. R.P.R., *8*, 365 (1958).
95. GHEORGHE S. D., H. D. SCHELL, *Sinteza succinilcolinei (diclorura).* St. cerc. biochim., *1*, 167 (1958).
96. GHEORGHE VICTORIA, *Acţiunea hidrocarburilor ca fază lipoidică nemiscibilă cu apa şi a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activităţii catalazei hepatice de porc.* Com. Acad. R.P.R., *2*, 35 (1952).
97. GHEORGHE VICTORIA, *Exosmoza electroliţilor din seminţele de grîu în cursul iarovizării.* St. cerc. biochim., *1*, 163 (1958); Rev. Chim. Acad. R.P.R., *5*, 151 (1960).
98. GHEŢIE V., *Cercetări asupra proteinelor din fasole* (Phaseolus vulgaris). I. *Caracterizarea proteinelor din sămînţă.* St. cerc. biochim., *2*, 169 (1959).
99. GHEŢIE V., *Cercetări asupra proteinelor din fasole* (Phaseolus vulgaris). *II. Modificarea proteinelor din sămînţă în timpul germinaţiei.* St. cerc. biochim., *2*, 293 (1959).
100. GHEŢIE V., *Cercetarea comparativă a proteinelor citoplasmatice şi vacuolare din frunze.* St. cerc. biochim., *2*, 441 (1959).
101. GHEŢIE V., *Elektroforeticeskie issledovaniia nekatorîh tkanevîh belkov rastitelnogo proizhojdenia (Cercetarea electroforetică a unor proteine tisulare de origine vegetală).* Rev. Chim. Acad. R.P.R., *5*, 139 (1960).
102. GHEŢIE V., *Mărirea capacităţii de rezoluţie electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat.* St. cerc. biochim., *4*, 397 (1961).
103. GHEŢIE V., *A hypothesis on the mechanism of reserve proteins hydrolysis during seed germination.* Rev. roum. Biochim., *3*, 353 (1966).
104. GHEŢIE V., *Evolution of protein character in ontogenesis of higher plants*, în *Mechanism of mutation and inducing factors*, ed. by Z. Landa, Praga, 1966, p. 489.
105. GHEŢIE V., *Fluoro-imunoelectroforeza.* St. cerc. biochim., *9*, 359 (1966); Immunochemistry, *4*, 467 (1967).
106. GHEŢIE V., *Pflanzenkryoproteine und ihre Rolle bei der Samenkeimung.* Proc. Internat. Symp., Physiol., Ecology and Biochem. of Germ., Greifswald, 1967, p. 591.
107. GHEŢIE V., *Caracterizarea imunoelectroforetică a lanţurilor polipeptidice şi a fragmentelor IgG de iepure.* St. cerc. biochim., *11*, 385 (1968).
108. GHEŢIE V., *Determinarea tipurilor de anticorpi din serurile imune prin fluoro- şi radioimunoelectroforeza.* Doc. Haemat., *2*, 45 (1968).
109. GHEŢIE V., *The localization of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonic acid in Fd and Fd' fragments of rabbit IgG.* Rev. roum. Biochim.,*5*, 121 (1968).
110. GHEŢIE V., *Evenimente celulare care stau la baza catabolizării imunoglobulinelor.* Microbiologia, parazitologia şi epidemiologia, *17* (1972).
111. GHEŢIE V., *Capacitatea macrofagelor de a degrada imunoglobulina G omologă.* St. cerc. biochim., *15* 167, (1972).
112. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Blocarea reacţiei de brunificare în vederea cercetării proteinelor din sucul celular al frunzei.* St. cerc. biochim., *3*, 181 (1960); Rev. Chim. Acad. R.P.R., *6*, 143 (1961).
113. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Proteinele de rezervă şi proteinele protoplasmatice din sămînţa de fasole* (Phaseolus vulgaris). St. cerc. biochim., *4*, 241 (1961).
114. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Crioproteinele vegetale.* St. cerc. biochim., *5*, 65 (1962).
115. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Cercetări imunochimice asupra germinaţiei la bob* (Vicia faba). St. cerc. biochim., *5*, 541 (1962).
116. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Analiza electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor citoplasmatice în procesul dezvoltării frunzei de bob* (Vicia faba). St. cerc. biochim., *6*, 49 (1963).
117. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Obţinerea sucului plasmatic din seminţe.* St. cerc. biochim., *6*, 235 (1963).
118. GHEŢIE, V., LUCIA BUZILĂ, *Crioprecipitarea în sucurile plasmatice ale unor seminţe.* St. cerc. biochim., *7*, 47 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 41 (1964).
119. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *Localizarea crioproteinelor în seminţe.* St. cerc. biochim., *7*, 367 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 293 (1964).
120. GHEŢIE V., LUCIA BUZILĂ, *The modification of antigenic properties of tissues during seed germination and development of horse bean plants* (Vicia faba). Biol. Plantarum (Praga), *6*, 202 (1964).

121. GHEȚIE V., LUCIA BUZILĂ, *L'hétérogénéité de la viciline des graines de pois (Pisum sativum).* Rev. roum. Biochim., *5*, 271 (1968).
122. GHEȚIE V., LUCIA BUZILĂ, *Relationship between pH-dependent conformational change of rabbit immunoglobulin G and its digestibility by papain.* Rev. roum. Biochim., *9*, 125 (1972).
123. GHEȚIE V., LUCIA BUZILĂ, SILVIA MIHĂESCU, *Păstrarea fragmentelor de antigen în situsurile de combinare ale subunităților de anticorp rezultate din hidroliza și reducerea complexelor imune.* St. cerc. biochim., *13*, 265 (1970).
124. GHEȚIE V., N. ST. CHIȘIU, SILVIA MIHĂESCU, *Susceptibilitatea diferită a imunoglobulinelor A umane de tip seric și secretor la hidroliza cu papainâ. Speculații asupra capacității „piesei secretoare" de a proteja molecula de IgA de acțiunea enzimelor proteolitice din secreții.* St. cerc. biochim., *14*, 371 (1971).
125. GHEȚIE V., CORINA DRAGOMIRESCU, *Detection by immunodiffusion of proteins separated by TLC on Sephades G-200.* Rev. roum. Biochim., *4*, 185 (1967).
126. GHEȚIE V., CORINA DRAGOMIRESCU, *The characterization of a „trypsin resistant", fraction of the heat denaturated rabbit immunoglobulin G.* Rev. roum. Biochim., *5*, 209 (1968).
127. GHEȚIE V., C. MEDEȘAN, *Raporturi antigenice între serul sanguin, mucoasa intestinală și sucul intestinal la șobolan, cu referire specială la apariția unui antigen nou în sucul intestinal, în urma ligaturării canalului biliar.* St. cerc. biochim., *11*, 17 (1968).
128. GHEȚIE V., C. MEDEȘAN, *The in vitro breakdown of rabbit immunoglobulin G by subcellular fractions isolated from rat intestinal mucosa.* Rev. roum. Biochim., *6*, 117 (1969).
129. GHEȚIE V., C. MEDEȘAN, N. ȘT. CHIȘIU, *Distribuția și modificarea antigenicității albuminei umane fluorescente, reținută în organele, celulele și umorile unor animale de experiență.* St. cerc. biochim., *10*, 19 (1967).
130. GHEȚIE V., C. MEDEȘAN, N. ȘT. CHIȘIU, *Retention and degradation of fluorescent human albumin by the small intestine of rats perfused in situ.* Rev. roum. Biochim., *4*, 119 (1967).
131. GHEȚIE V., SILVIA MIHĂESCU, *The intramolecular distribution of a fluorescent dye in rabbit immunoglobulin G.* Rev. roum. Biochim., *6*, 197 (1969).
132. GHEȚIE V., SILVIA MIHĂESCU, LUCIA BUZILĂ, *Utilizarea cromatografiei de excludere moleculară la izolarea și purificarea anticorpilor din precipitatele imune fluorescente.* St. cerc. biochim., *10*, 325 (1967).
133. GHEȚIE V., CECILIA MOTAȘ, *Catabolizarea imunoglobulinei G de către formațiunile subcelulare bogate în lizozomi, izolate din ficat.* St. cerc. biochim., *13*, 135 (1970); Immunochemistry, *8*, 89 (1971).
134. GHEȚIE V., CECILIA MOTAȘ, *Hidroliza enzimatică a fragmentului Fab din IgG de iepure realizată cu o fracțiune subcelulară bogată în catepsine izolată din ficatul de șobolan.* St. cerc. biochim., *13*, 365 (1970); Immunochemistry, *8*, 1021 (1971).
135. GHEȚIE V., CECILIA MOTAȘ, SILVIA MIHĂESCU, *Is the rabbit IgG cleavage by papain pH-dependent?* Rev. roum. Biochim., *6*, 29 (1969).
136. GHEȚIE V., D. MOȚET-GRIGORAȘ, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză.* St. cerc. biochim., *5*, 409 (1962).
137. GHEȚIE V., D. MOȚET-GRIGORAȘ, CORINA DRAGOMIRESCU, *Procedeu rapid pentru prepararea agarozei.* St. cerc. biochim., *8*, 337 (1965).
138. GHEȚIE V., DOINA ONICĂ, *Gradul eterogenității lanțurilor ușoare ale imunoglobulinelor evidențiat prin metoda focalizării izoelectrice.* St. cerc. biochim., *14*, 33 (1971); Experientia, *27*, 209 (1971).
139. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Neue synthetische Agarosenderivate und ihre Anwendung in der Elektrophorese und Chromatographie.* Rev. roum. Biochim., *4*, 179 (1967).
140. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Elektrophorese und Immunoelektrophorese im Carboxymethyl-Agarosegel.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., *349*, 719 (1968).
141. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Immunosorbenten auf Agarosebasis.* Rev. roum. Biochim., *5*, 65 (1968).
142. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Bindung von Proteinen an Carboxymethyl- und 1-Aminonaphtalin-5-sulfonil-Agarose und Verwendung der Kupplungsprodukte als immunoadsorbenzien.* Rev. roum. Biochim., *7*, 115 (1970).
143. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Uscarea gelurilor perlate de agaroză.* St. cerc. biochim., *15*, 107 (1972); Experientia, *27*, 1384 (1971).
144. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, LUCIA BUZILĂ, *Säulenchromatographie an CM-Agarosegelen.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., *350*, 1675 (1969).

145. GHEȚIE V., A. SULICĂ, *Captarea și degradarea intracelulară a IgG de iepure de către leucocitele polimorfonucleare izolate din lichidul peritoneal de cobai.* St. cerc. biochim., *12*, 251 (1969).
146. HAGIMA-CĂLIN IOANA, *Peroxidaza din porumb în primele etape de creștere.* St. cerc. biochim. *13*, 47 (1970).
147. HANSON L. A., CECILIA MOTAȘ, J. BARRET, B. G. JOHANSSON, *Studies on the immunoglobulin of human milk: secretory IgA.* Second International Symposium of immunology of reproduction, Varna 1971.
148. HÖRER, O. L., N. C. ZAHARIA, H. D. SCHELL, *Studiul unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben complexabile cu acizii nucleici.* Rev. roum. Chim., *17*, (1972).
149. HULUȚĂ, C., CORINA IORDACHE, H. D. SCHELL, O. CONSTANTINESCU, V. BENEA, *Răsărirea semințelor și metabolismul puieților de* Fraxinus excelsior *L. rezultați din semințele tratate cu soluții radioactive de* ^{32}P. St. cerc. biochim., *4*, 527 (1961).
150. IORDACHE CORINA, *Aplicarea metodei picăturilor la cercetarea difuziei acidului acetic prin membrana lichidă toluen-apă.* St. cerc. chim., *1*, 51 (1953).
151. IORDACHE CORINA, *Acțiunea unor săruri cuaternare de amoniu asupra comportării mușchiului drept abdominal de broască față de acetilcolină.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 1181 (1955).
152. IORDACHE CORINA, *Rolul excitațiilor și efortului mecanic în descompunerea fosfagenului de mușchi în diferite stări de excitabilitate.* St. cerc. biochim., *7*, 195 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 156 (1964).
153. IORDACHE CORINA, *Acțiunea ARN asupra nivelului fosfocreatinei și activitatea ribonucleazei din mușchi în miotonia experimentală.* Primul simpozion național „Acizi nucleici biologic activi", Centr. doc. Acad. R.S.R., 1967 p. 197.
154. IORDACHE CORINA, *L'action de l'ARN sur le taux de la phosphocréatine musculaire dans la myotonie expérimentale.* Rev. roum. Biochim., *4*, 287 (1967).
155. IORDACHE CORINA, *Activitatea ribonucleazelor din mușchiul sartorius de broască în stare normală și în miotonia experimentală.* St. cerc. biochim., *11*, 399 (1968).
156. IORDACHE CORINA, *Cromatografia proteinelor sacroplasmatice și localizarea ribonucleazelor din mușchiul sartorius de broască.* St. cerc. biochim., *12*, 355 (1969).
157. IORDACHE CORINA, *Ribonucleazele din mușchi în seria vertebratelor.* St. cerc. biochim., *14*, 49 (1971).
158. IORDACHE CORINA, *Distribuția ribonucleazei acide pe fracțiunile subcelulare obținute din mușchii striați ai unor vertebrate.* St. cerc. biochim., *14*, 395 (1971).
159. IORDACHE CORINA, CORINA DRAGOMIRESCU, *Acțiunea unor substanțe curarizante asupra carnozinei din mușchiul gastrocnemian de broască.* St. cerc. biochim., *3*, 299 (1960).
160. IORDACHE CORINA, S. S. VASU, *Muscle nucleic acids, DNA and RNA molecular species in different frog muscles.* Rev. roum. Biochim., *6*, 305 (1969).
161. MACOVSCHI E., *Recherches sur la permeabilité des membranes liquides. Note I. Un dispositif photoélectrique pour les recherches sur la permeabilité des membranes liquides.* Bull. Scient. Acad. Roumaine, *30*, 465 (1948).
162. MACOVSCHI E., *Direcții noi de cercetare în domeniul permeabilității membranelor.* Ann. Acad. R.P.R., seria Geol. Geogr., *3*, 313 (1950).
163. MACOVSCHI E., *Cercetări preliminare asupra acțiunii unui preparat de cupru și zinc în afecțiunile reumatismale.* Bul. Acad. R.P.R., secția Șt. med., *3*, 171 (1951).
164. MACOVSCHI E., *Cercetări asupra permeabilității membranelor lichide. Nota III. O metodă nouă (metoda picăturilor) pentru cercetarea permeabilității membranelor lichide.* Bul. șt. Acad. R.P.R., seria Geol. geogr., *3*, 229 (1951).
165. MACOVSCHI E., *Cinetica fermentului catalaza și calculul constantelor din ecuația respectivă.* Com. Acad. R.P.R., *2*, 29 (1952).
166. MACOVSCHI E., *Câteva considerațiuni teoretice în legătură cu „metoda picăturilor" pentru cercetarea permeabilității membranelor lichide.* Com. Acad. R.P.R., *2*, 137 (1952).
167. MACOVSCHI E., *Exosmoza ca mijloc de cercetare a evoluției proceselor biochimice în semințele plantelor de cultură și rolul ei în stimularea și germinarea acestor semințe.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 1171 (1955).
168. MACOVSCHI E., *Untersuchungen an Koazervaten aus nativen Proteinen*, în *Zweites Internationales Symposium über den Mechanismus der Erregung*, 1958, VEB-Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

169. MACOVSCHI E., *Cîteva aspecte ale cercetării biochimice în problema stimulării semințelor plantelor agricole*, în *Hommage à M. Popov*, Edit. Acad. Sci. Bulgare, Sofia, 1968, p. 169.
170. MACOVSCHI E., *Metoda capilară pentru introducerea compușilor chimici și produșilor biologici în corpul plantelor.* Com Acad. R.P.R., *8*, 183 (1958); Preslia, *30*, 252 (1958); Seliskoe khozeaistwo za rubezhort, *3*, 31 (1963).
171. MACOVSCHI E., *Aplicarea metodei firului pentru colchicinizări și tratarea plantelor cu substanțe de creștere.* Com. Acad. R.P.R., *2*, 189 (1958).
172. MACOVSCHI E., *Materia vie și geneza ei.* Rev. Chim. Acad. R.P.R., *4*, 11 (1959).
173. MACOVSCHI E., *Unele considerații cu privire la problema membranelor celulare și a permeabilității lor.* St. cerc. biochim., *4*, 9 (1961); Rev. Chim. Acad. R.P.R., *7*, 309 (1962).
174. MACOVSCHI E., *Unele perspective ale cercetării biochimice în domeniul hibridării vegetative la plante.* St. cerc. biochim., *5*, 193 (1962); Biochim. Biol. Sperim., *2*, 99 (1962); Biul. Nauk. Inf., *1*, 7 (1962).
175. MACOVSCHI E., *Einige neue Anschaungen über die Natur der lebenden Materie in Beziehung zur Biochemie des Krebses.* Vitalstoffe u. Zivilisationskrankh., *8*, 48 (1963).
176. MACOVSCHI E., *Materia vie și rolul ei în hibridarea plantelor.* St. cerc. biochim., *6*, 4 (1963).
177. MACOVSCHI E., *Unele aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii.* St. cerc. biochim., *7*, 5 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 5 (1964).
178. MACOVSCHI E., *Unele probleme ale mecanismelor de reglare și ale structurii materiei vii.* St. cerc. biochim., *8*, 253 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 189 (1965).
179. MACOVSCHI E., *Materia vie și distribuția asimetrică a electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial.* St. cerc. biochim., *8*, 371 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 285 (1965).
180. MACOVSCHI E., *Teoria structurii și repartiția electroliților dintre lichidul de perfuzie și mușchii trenului posterior de broască.* St. cerc. biochim., *9*, 123 (1966); Rev. roum. Biochim, *3*, 169 (1966).
181. MACOVSCHI E., *Materia vie și premise ale unei teorii moleculare a memoriei.* St. cerc. biochim., *9*, 231 (1966); Rev. roum. Biochim., *3*, 249 (1966).
182. MACOVSCHI E., *Materia vie și problema raporturilor dintre medicamente și enzime.* St. cerc. biochim., *9*, 3 (1966); Rev. rom. Biochim., *3*, 321 (1966).
183. MACOVSCHI E., *Unele perspective ale investigațiilor cantitative în cadrul teoriei moleculare a memoriei.* St. cerc. biochim., *10*, 3 (1967); Rev. roum. Biochim., *4*, 17 (1967).
184. MACOVSCHI E., *The living matter and the relationship between noxious substances and drugs.* Rev. roum. Biochim., *5*, 3 (1968).
185. MACOVSCHI E., *Le rôle de la biostructure dans le mécanisme d'action des hormones.* Rev. roum. Biochim., *5*, 253 (1968); Vitalstoffe Zivilisationskrankh., *14*, 17 (1969).
186. MACOVSCHI E., *Teoria biostructurii și problema transportului activ al ionilor de sodiu în axonii giganți de Sepia.* St. cerc. biochim., *11*, 273 (1968).
187. MACOVSCHI E., *Acțiunea inhibitorilor metabolici asupra efluxului și influxului ionilor de sodiu la axonii giganți de* Sepia (*considerații în lumina teoriei biostructurii*). St. cerc. biochim., *12*, 5 (1969).
188. MACOVSCHI E., *Eliberarea parțială a apei biostructurate în prezența inhibitorilor metabolici.* St. cerc. biochim., *12*, 105 (1969).
189. MACOVSCHI E., *Testarea valabilității teoriei biostructurii.* St. cerc. biochim., *12*, 209 (1969).
190. MACOVSCHI E., *Role of biostructure in the genesis of intracellular formations.* Preliminary note. Rev. roum. Biochim., *6*, 3 (1969).
191. MACOVSCHI E., *La biostructure et les inhibiteurs du métabolisme, leur importance pour la médecine.* Vitalstoffe-Zivilisationskrankh., *15*, 48 (1970).
192. MACOVSCHI E., *Teoria biostructurală a undelor electroencefalografice.* St. cerc. biochim., *13*, 331 (1970); Protectio Vitae, *1*, 30 (1971).
193. MACOVSCHI E., *Demonstrarea existenței biostructurii.* St. cerc. biochim., *14*, 239 (1971).
194. MACOVSCHI E., *The base of biostructure theory. The necessity of elaborating a new conception about the nature of living matter.* Biochim. Biol. Sperim., *10*, 77 (1971—1972).
195. MACOVSCHI E., *Some new ideas about the life origin.* Protectio vitae *1*, 129 (1971); Biochim. Biol. Sperim., *9*, 225 (1971).
196. MACOVSCHI E., *The biostructure as a cell ultrastructure.* Rev. roum. Biol., *17*, 137 (1972).

197. MACOVSCHI E., *La biostructure et sa signification pour l'allergologie.* Protectio vitae, *17*, 24 (1972).
198. MACOVSCHI E., LIA ARNET, *Acţiunea unor emulsii şi a colesterolului coloidal asupra activităţii amilazei din malţ.* St. cerc. biochim., *2*, 7 (1959).
199. MACOVSCHI E., LIA ARNET, *Relaţii dintre amilaza, lipaza şi fosfataza alcalină din serul sanguin uman şi coacervatul obţinut din acest ser cu guma arabică.* St. cerc. biochim., *4*, 15 (1961).
200. MACOVSCHI E., LIA ARNET, BIANCA ROSENZWEIG, *Obrazovanie i povedenie zhelatino-gummiarabikovyh koazervatov i prirustvie proteoliticheskih fermentov i prischevaritelnyh sokov.* Rev. Chim. Acad. R.P.R., *2*, 287 (1957); Com. Acad. R.P.R., *5*, 1473 (1955).
201. MACOVSCHI E., LILICA BOTOŞENEANU, *Acţiunea lecitinei asupra pătrunderii novocainei prin membrana lichidă apă-alcool izoamilic.* St. cerc. chim., *4*, 31 (1956).
202. MACOVSCHI E., LILICA BOTOŞENEANU, *Exosmoza hidrochinonei din glomerulele sfeclei de zahăr după stimulare cu această substanţă.* St. cerc. biochim., *1*, 177 (1958).
203. MACOVSCHI E., LILICA BOTOŞENEANU, *Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante.* St. cerc. biochim., *6*, 486 (1963).
204. MACOVSCHI E., MIOARA CÂRSTEANU, *Prepararea din spermă a hialuronidazei brute sub formă de praf.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 1463 (1955).
205. MACOVSCHI E., MIOARA CÂRSTEANU, *Coacervatul dintre proteinele serului sanguin uman şi guma arabică.* St. cerc. biochim., *2*, 111 (1959).
206. MACOVSCHI E., MIOARA CÂRSTEANU, ALEXANDRINA POPESCU, *Metodă pentru determinarea exosmozei electroliţilor din colul uterin.* St. cerc. biochim., *7*, 151 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 119 (1964).
207. MACOVSCHI E., S. COMOROŞAN, *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliţilor din piele.* St. cerc. Chim., *4*, 271 (1956); Arztl. Forsch., *5*, II/41 (1958).
208. MACOVSCHI E., IRINA CORNOIU, *Eliberarea apei, a substanţelor hidrosolubile şi a ionilor de potasiu şi calciu din biostructura fructelor de măr şi a frnnzelor de varză în cursul păstrării.* St. cerc. biochim., *14*, 255 (1971).
209. MACOVSCHI E., DITA COTARIU, *Acţiunea clorhidratului de novocaină asupra permeabilităţii membranei branhiale vii de* Cyprinus carpio *pentru saponină.* Com. Acad. R.P.R., *7*, 31 (1957).
210. MACOVSCHI E., LUCIA CRISTEA, *Coeficientul de temperatură al consumului de oxigen, ca indice biochimic al adaptării seminţelor diferitelor soiuri de grîu la condiţiile mediului.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 1467 (1955).
211. MACOVSCHI E., VIORICA ELEFTERESCU, *The influence of 2,4-dinitrophenol and arsenite upon the amount and the repartition of piruvate between the intracellular solution and the biostructure of leaves of maize plantlets.* Rev. roum. Biochim., *9*, 192 (1972).
212. MACOVSCHI E., VIORICA FRUNZETI, La phosphatase acide et le phosphore inorganique dans les sucs des feuilles de chou. Rev. roum. Biochim., *5*, 165 (1968).
213. MACOVSCHI E., VIORICA FRUNZETI, Eliberarea apei şi a altor substanţe din biostructura frunzelor de porumb sub acţiunea inhibitorilor metabolici. St. cerc. biochim., *12*, 19 (1969).
214. MACOVSCHI E., VIORICA FRUNZETI-ELEFTERESCU, *Ribonucleazele în sucurile frunzelor de porumb (Consideraţii în lumina teoriei biostructurii).* St. cerc. biochim., *12*, 115 (1969).
215. MACOVSCHI E., VIORICA FRUNZETI, LILICA BOTOŞENEANU, *Factorii fizico-chimici şi metabolici în transportul substanţelor în plante.* St. cerc. biochim., *4* 427 (1961).
216. MACOVSCHI E., VIORICA FRUNZETI, SANDA RĂDULESCU, *Migrarea pironinei şi albastrului de metilen prin tulpini de balsamine şi tomate.* St. cerc. biochim. *6*, 23 (1963).
217. MACOVSCHI E., VICTORIA GHEORGHE, *Acţiunea ciclohexanului ca fază lipoidică nemiscibilă cu apa şi a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activităţii catalizei hepatice.* Com. Acad. R.P.R., *1*, 477 (1951)
218. MACOVSCHI E., VICTORIA GHEORGHE, *Acţiunea hidrocarburilor ca fază lipoidică nemiscibilă cu apa şi a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activităţii catalazei hepatice de cal.* Bul. Şt. Acad. R.P.R., *4*,473 (1952).
219. MACOVSCHI E., CORINA IORDACHE, *Difuzia acidului acetic prin membrana lichidă toluen-apă şi acţiunea unora dintre componentele nesaponifiabilului 'lipoizilor naturali asupra acestei difuzii.* Com. Acad. R.P.R., *1*, 409 (1951).

220. MACOVSCHI E., CORINA IORDACHE, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului.* St. cerc. biochim., *5*, 193 (1962).
221. MACOVSCHI E., CORINA IORDACHE, *Coeficienții izometrici și relațiile dintre efort și fosfagenul muscular.* St. cerc. biochim., *6*, 181 (1963).
222. MACOVSCHI E., CORINA IORDACHE, CORINA DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate și excitabilitate musculară.* St. cerc. biochim. *4*, 171 (1961); Bioch. e Biol. Sperim., *1*, 319 (1961/1962).
223. MACOVSCHI E., XENIA MĂMĂLIGĂ, *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic* Nota I. *Precipitarea proteidelor din serul sanguin uman normal și canceros prin acid sulfosalicilic ce difuzează din alcool amilic în ser.* Bul. Șt. seria A, *1*, ; 501 (1949).
224. MACOVSCHI E., IRINA MARINEANU, *The structure theory, the state of protoplasm water and the problem of plant sap origin.* Rev. roum. Biochim., *4*, 235 (1967)
225. MACOVSCHI E., IRINA MARINEANU, *Potassium, calcium and sodium ions in corn leaf saps.* Rev. roum. Biochim., *5*, 257 (1968).
226. MACOVSCHI E., M. MIKIETIUK, *Cercetări asupra permeabilității membranelor lichide* Bul. șt. Acad. R.P.R., *1*, 171 (1949).
227. MACOVSCHI E., NATALIA MOLDOVEANU, *A simplification of Thunberg's method for determining of dehydrases.* St. cerc. biochim., *1*, 389 (1958); Rev. chim. Acad. R.P.R., *3*, 191 (1958).
228. MACOVSCHI E., FLORENTINA MOSORA, *The problem of sodium ion efflux from living giant axons of Sepia.* Rev. roum. Biochim., *8*, 97 (1971).
229. MACOVSCHI E., D. MOȚET-GRIGORAȘ, *Die Werwendung des Polarographen für potentiometrische pH-Bestimmungen.* Rev. chim. Acad. R.P.R., *2*, 293 (1957); Com. Acad. R.P.R., *8*, 781 (1958).
230. MACOVSCHI E., CONSTANȚA MUȘOLAN, *The reducing sugars in saps of cineraria, lettuce and cabbage leaves (Some considerations in the light of biostructure theory).* Rev. roum. Biochim., *6*, 89 (1969).
231. MACOVSCHI E., VIORICA PANAITIDE, *Iodurile și clorurile sărurilor cuaternare de amoniu ale amidei și acidului N-cetil-nicotinic.* Com. Acad. R.P.R., *1*, 955 (1951)
232. MACOVSCHI E., VIORICA PANAITIDE, *Exosmoza fosforului anorganic din semințele grîului de toamnă A_{15} în cursul iarovizării.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 811 (1955).
233. MACOVSCHI E., AURELIA PETRESCU, *Mecanismul formării azoxiderivaților din nitro-derivați sub acțiunea cetonelor aromatice.* Bul. șt. Acad. R.P.R., A, *1*, 485 (1949).
234. MACOVSCHI E., AURELIA PETRESCU, *Reducerea 2-nitro-fluorenului și a unor derivați, cu ajutorul benzoinei* Bul. St. Acad. R.P.R., seria Biologie, *2*, 113 (1950).
235. MACOVSCHI E., AURELIA PETRESCU, *2-cian și 2-amido-p-azoxistilbenii substituiți* Bul. șt. Acad. R.P.R., seria Biologie, *2*, 209 (1950).
236. MACOVSCHI E., CRISTINA PRETORIAN, *Acțiunea toluenului și a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activității polifenoloxidazei din cartofi.* Com Acad. R.P.R., *1*, 1063 (1951).
237. MACOVSCHI E., MARIA RĂDULESCU, *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic. Nota IV. Un model nou de electrodă pentru determinarea pH-ului vaginal in situ* Acad. R.P.R., Lucrările sesiunii generale științifice din 1950.
238. MACOVSCHI R., MARIA RĂDULESCU, *Acțiunea cîtorva stilbeni și azocoloranți asupra degradării prin pepsină a ovalbuminei denaturate.* Bul. șt. Acad. R.P.R. seria științe biologice, *3*, 715 (1951).
239. MACOVSCHI E., SANDA RĂDULESCU, *Introduction et distribution de la peroxydase de raifort dans les plantes de tomates.* Rev. roum. Biochim., *1*, 245 (1964); St. cerc. biochim., *7*, 315 (1964).
240. MACOVSCHI E., TR. RĂDULESCU. *Reducerea unor meta-nitro-amide aromatice cu ajutorul pulberei de zinc.* Bul. șt. Acad. R.P.R., *1*, 253 (1949).
241. MACOVSCHI E., TR. RĂDULESCU, *Unele comportări chimice ale nitro-amido-stilbenilor.* Com. Acad. R.P.R., *1*, 355 (1951).
242. MACOVSCHI E., TR. RĂDULESCU, LORA SCOLNIC, *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării mușchiului.* St. cerc. biochim., *5*, 485 (1962).
243. MACOVSCHI E., BIANCA ROSENZWEIG, *Analogia dintre furoină și vitamina C.* Com. Acad. R.P.R., *1*, 959 (1951).
244. MACOVSCHI E., CORINA SARMANIOTI, *Modificarea metodei G. Bertrand și a tehnicii Bierri pentru dozarea glucozei.* St. cerc. biochim., *1*, 271 (1958).
245. MACOVSCHI E., CECILIA ȘELARIU, SILVIA MIHĂESCU, S. S. VASU, *Activitatea fosfatazică, colinesterazică și citocromoxidazică a formațiunilor intracelulare din*

creier de șobolani în diferite stări funcționale. Com. Acad. R.P.R., *8*, 275 (1958); St. cerc. biochim., *1*, 7 (1958); Ucrainsk. Biohim. J. *30*, 18 (1958).

246. MACOVSCHI E., OLIMPIA STROESCU, *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic. Nota III. Schimbarea în timp a viscozității serului sanguin uman normal și patologic sub acțiunea $HgCl_2$.* Acad. R.P.R., Lucrările sesiunii generale științifice din 1950.

247. MACOVSCHI E., LIDIA VAICUM, *Fenomenele care se produc în două lichide nemiscibile (apă, toluen) cînd a treia componentă lichidă (acid acetic) difuzează dintr-o fază în alta.* Bul. șt. Acad. R.P.R., seria Biologie, *3*, 723 (1951).

248. MACOVSCHI E., S. S. VASU, MIOARA CÂRSTEANU, *Acțiunea ureazei și β-amilazei asupra ureei, respectiv amidonului în prezența unor coacervate gluco-proteice.* St. cerc. biochim., *1*, 297 (1958); Rev. chim. Acad. R.P.R., *2*, 280 (1957); Com. Acad. R.P.R., *7*, 933 (1957).

249. MACOVSCHI E., ODETTE ZAHARIA, *Acțiunea prolinei asupra aminoacizilor și substanțelor proteice din floarea-soarelui.* St. cerc. biochim., *3*, 7 (1960); Rev. chim. Acad. R.P.R., *6*, 67 (1961).

250. MACOVSCHI E., ODETTE ZAHARIA, LUCIA BUZILĂ, *Asimilarea azotatului de amoniu introdus în plante de tomate prin metoda capilară.* St. cerc. biochim., *2*, 17 (1959); Rev. chim. Acad. R.P.R., *5*, 49 (1960).

251. MACOVSCHI E., ODETTE ZAHARIA, NATALIA MOLDOVEANU, *Evoluția glutenului și a ionilor de amoniu, ca aspecte ale metabolismului proteic din semințele grîului de toamnă A_{15} supuse iarovizării.* Bul. șt. Acad. R.P.R., *7*, 199 (1955).

252. MACARIE O., D. TĂNĂSESCU, NATALIA MOLDOVEANU, *Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor serice provenite de la șobolani masculi cu sindrom litiazic renal indus prin etilen-glicol.* St. cerc. biochim., *14*, 285 (1971).

253. XENIA MĂMĂLIGĂ, *Cercetarea polarografică a activității interfaciale a unor săruri cuaternare de amoniu.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 1583 (1955).

254. XENIA MĂMĂLIGĂ, *Influența unor săruri cuaternare de amoniu asupra reducerii oxigenului la nivelul electrodului picător de mercur.* St. cerc. biochim., *2*, 413 (1959).

255. XENIA MĂMĂLIGĂ, S. D. GHEORGHE, *Cercetarea polarografică a activității interfaciale a unor săruri cuaternare de amoniu de tipul „bis-onium-acetil-derivați ai o-, m-, p-fenilendiaminei și benzidinei".* St. cerc. biochim., *2*, 73 (1959).

256. XENIA MĂMĂLIGĂ, M. ȘERBAN, *Polarographische Untersuchung über die interfazielle Aktivität einiger Curarewirksamer in der Medizin benützter Substanzen.* Rev. Chim. Acad. R.P.R., *2*, 325 (1957).

257. MEDEȘAN C., *Compararea unor metode de dozare a fosfocreatinei musculare în diferite condiții experimentale.* St. cerc. biochim., *7*, 67 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 59 (1964).

258. MEDEȘAN C., *Nivelul fosfocreatinei după administrarea, respectiv imersarea mușchilor în soluții de fosfați și creatină.* St. cerc. biochim., *7*, 375 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 303 (1964).

259. MEDEȘAN C., *La perfusion des muscles striés, moyen d'investigation du biochimisme musculaire.* Rev. roum. Biochim., *3*, 363 (1966).

260. MEDEȘAN C., *Participarea glicolizei la biosinteza fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască perfuzați.* St. cerc. biochim., *11*, 173 (1968).

261. MEDEȘAN C., MARIA STOICA, *Acțiunea bromurei chinindihomoneurinei asupra respirației, presiunii arteriale și reacția motoare la cîine.* Com. Acad. R.P.R., *8* 177 (1958).

262. MEDEȘAN C., MARIA STOICA, *Acțiunea unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la 2,7-diaminofluoren asupra organismului animal.* St. cerc. biochim., *3*, 417 (1960).

263. MEDEȘAN C., NATALIA MOLDOVEANU, *ATP breakdown after shortterm contractions of the muscles with creatine phosphate decrease by perfusion with 2.4-dinitrophenol.* Rev. roum. Biochim., *6*, 43 (1969).

264. MEDEȘAN C., D. TĂNĂSESCU, *Glycolysis and glycogenphosphorylase activity in frog muscle perfused with 2.4-dinitrophenol and stimulated electrically.* Rev. roum. Biochim., *7*, 215 (1970).

265. MICUȘAN V., LUCIA BUZILĂ, *Relații antigenice între proteinele serice materne, imunoglobulinele din colostru și proteinele serice de la noul născut la bovine.* St. cerc. biochim., *7*, 213 (1964); Rev. roum. Biochim. *1*, 169 (1964).

266. MIHĂESCU SILVIA, *Distribution of 1-dimethylaminonaphtalene-5-sulphonic acid in the polypeptide chains of rabbit G-globulin.* Rev. roum. Biochim., *4*, 41 (1967).

267. MIHĂESCU SILVIA, *L'hétérogénéité de la chaine polypeptidique L, de l'IgG de lapin.* Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique en gel d'agarose avec urée 3 M. Rev. roum. Biochim., *4*, 193 (1967).
268. MIHĂESCU SILVIA, *Fluorocromarea distructivă a anticorpilor.* St. cerc. biochim., *11*, 281 (1968).
269. MIHĂESCU SILVIA, *Purificarea parțială a catepsinei D din ficatul de șobolan.* St. cerc. biochim., *13*, 155 (1970).
270. MIHĂESCU SILVIA, DOINA CILIEVICI, *L'isolement des anticorps purs à l'aide d'une suspension fine de PAB-cellulose.* Rev. roum. Biochim., *6*, 51 (1969).
271. MIHĂESCU SILVIA, V. GHEȚIE, *Variații individuale în producerea anticorpilor precipitanți la cobaii inoculați cu γ G-globulină sau proteine serice de iepure.* Studiu imunoelectroforetic. St. cerc. biochim., *10*, 273 (1967).
272. MIHĂESCU SILVIA, V. GHEȚIE, *Hidroliza cu catepsina E a imunoglobulinei G de iepure.* St. cerc. biochim., *14*, 163 (1971).
273. MIHĂESCU SILVIA, V. GHEȚIE, *Hidroliza imunoglobulinei G de iepure cu catepsină D purificată.* St. cerc. biochim., *15*, 55 (1972).
274. MIHĂILESCU F., *Studiu electroforetic al amilazelor secarei, orzului și ovăzului în primele etape de creștere.* St. cerc. biochim., *13*, 285 (1970).
275. MIHĂILESCU V., *Valoarea reacției viscozimetrice (Macovschi) în cadrul testelor de disproteinemie.* Bul. șt., secția Șt. biol. agronom. geol. geogr., *4*, 189 (1952).
276. MOLDOVEANU NATALIA, *Acțiunea anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu.* Com. Acad. R.P.R., *7*, 39 (1957).
277. MOLDOVEANU NATALIA, *Acetilcolina și activitatea succindehidrazică a omogenatelor de mușchi, creier și inimă de șobolan alb.* St. cerc. biochim., *1*, 265 (1958).
278. MOLDOVEANU NATALIA, *Activitatea colinesterazică din creier în curarizare.* St. cerc. biochim., *4*, 371 (1961).
279. MOLDOVEANU NATALIA, *Acțiunea anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la o-, m-, p-fenilendiamină și benzidină.* St. cerc. biochim., *7*, 277 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 71 (1964).
280. MOLDOVEANU NATALIA, *Acțiunea excitațiilor electrice asupra nivelului compușilor adenozinfosforici din mușchi.* St. cerc. biochim., *7*, 385 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 313 (1964).
281. MOLDOVEANU NATALIA, *The activity of 5'-adenylic acid deaminase in the muscular contraction.* Rev. roum. Biochim., *2*, 327 (1965).
282. MOLDOVEANU NATALIA, *The variation of the activity of adenosintriphosphatase during muscular contraction.* Rev. roum. Biochim., *4*, 47 (1967).
283. MOLDOVEANU NATALIA, *Variation in activity of myokinase* (ATP, *AMP-Phosphotransferase E.C. 2.7.4.3*) *during muscular contraction.* Rev. roum. Biochim., *5*, 69 (1968).
284. MOLDOVEANU NATALIA, *Influence of glycolysis final terms, iodoacetamide and 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene on the myokinase and creatinkinase activity.* Rev. roum. Biochim., *7*, 123 (1970).
285. MOLDOVEANU NATALIA, C. MEDEȘAN, *Acțiunea substanțelor curarizante asupra organismului animal.* St. cerc. biochim., *3*, 227 (1960).
286. MOLDOVEANU NATALIA, C. MEDEȘAN, *Activitatea miokinazei și creatinkinazei în mușchii perfuzați cu 2,4-dinitrofenol.* St. cerc. biochim., *13*, 399 (1970).
287. MOLDOVEANU NATALIA, D. TĂNĂSESCU, *Separation of miokinase, creatinkinase, ATP-ase and 5'-AMP-deaminase of the muscular sarcoplasmic proteins.* Rev. roum. Biochim., *5*, 281 (1968).
288. MOLDOVEANU NATALIA, D. TĂNĂSESCU, *The effect of ATP and lactic, pyruvic and citric acids on the activity of purified frog muscle phosphorylase b.* Rev. roum. Biochim., *8*, 47 (1971).
289. MOLDOVEANU NATALIA, D. TĂNĂSESCU, *The effect of nucleotide 5-phosphates on the lactate dehydrogenase isoenzymes H_4 and M_4 from the rabbit heart and muscle.* Biochim. e Biol. Sperimentale, *9*,... (1972).
290. MOTAȘ CECILIA, *Degradation de la sérumalbumine humaine par les formations intracellulaires de la rate de rat.* Rev. roum. Biochim., *5*, 135 (1968).
291. MOTAȘ CECILIA, *Distribuția proteazelor între formațiunile intracelulare de ficat de șobolan.* St. cerc. biochim., *13*, 169 (1970).
292. MOTAȘ CECILIA, V. GHEȚIE, *Scindarea enzimatică a IgG de iepure de către formațiunile subcelulare izolate din splina de iepure și de șobolan.* St. cerc. biochim., *12*, (1969); Immunochemistry, *6*, 547 (1969).

293. MOTAŞ CECILIA, V. GHEŢIE, SILVIA MIHĂESCU, *Degradarea regiunii Fc din imunoglobulina G de iepure de către catepsinele lizozomiale.* St. cerc. biochim., *14*, 171 (1971).
294. MOTAŞ CECILIA, L.A. HANSON, B.G. JOHANSON, CH. WADWORTH, *Dissociation of secretory IgA by a nucleotide dependent disulfide reductase.* Scand. J. Immunol., *1* (1972).
295. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Participarea fracţiunilor proteice din serul sanguin uman normal la formarea coacervatelor cu gumă arabică.* St. cerc. biochim., *2*, 181 (1959).
296. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Cercetarea polarografică a proteinelor din creierul de şobolan în cursul dezvoltării.* St. cerc. biochim., *2*, 449 (1959).
297. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Contribuţii la metode de cercetare a coacervării proteinelor din serum sanguin uman cu gumă arabică.* St. cerc. biochim., *3*, 303 (1960).
298. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Coacervarea formaţiunilor proteice din serum sanguin uman denaturat prin căldură.* St. cerc. biochim., *4*, 257 (1961); Rev. roum. Biochim., *1*, 321 (1964).
299. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor din serum sanguin uman în urma denaturării termice. I. Cercetări imunoelectroforetice în gel de agaroză.* St. cerc. biochim., *7*, 393 (1964); Rev. roum. Biochim., *2*, 37 (1965).
300. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor din serul sanguin uman în urma denaturării termice. II. Cercetări asupra fenomenului de „omogenizare electroforetică".* St. cerc. biochim., *8*, 59 (1965).
301. MOŢET-GRIGORAŞ D., *Cercetarea imunochimică a înglobării fracţiunilor proteice din serul sanguin uman în coacervatul cu acacia. Consideraţii asupra mecanismului de formare a coacervatelor.* St. cerc. biochim., *9*, 289 (1966).
302. MOŢET-GRIGORAŞ D., CORINA DRAGOMIRESCU, *Elaborarea de anticorpi în starea de excitaţie şi inhibiţie medicamentoasă.* St. cerc. biochim., *6*, 87 (1963).
303. MOŢET GRIGORAŞ D., V. GHEŢIE, *Electroforeza preparativă în gel de agaroză.* St. cerc. biochim., *7*, 221 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 175 (1964).
304. MUSOLAN CONSTANŢA, *Cîteva consideraţii asupra aplicării metodei Ogur-Rosen la dozarea acizilor nucleici din sucurile vacuolar şi plasmatic ale frunzelor de porumb.* St. cerc. biochim., *13*, 301 (1970).
305. OCSKAY SUZANA, VICTORIA GHEORGHE, CORINA IORDACHE, ANA MIHALACHE, *Cercetări fiziologice asupra germinaţiei seminţelor de frasin* (Fraxinus excelsior L.). Anal. Inst. cerc. forest., *19*, 31 (1958).
306. OLTEANU G., TĂNĂSESCU D., NATALIA MOLDOVEANU, *Caracterizarea prin electroforeză în gel de poliacrilamidă a unor soiuri şi linii de cartofi şi semnificaţia lor genetică.* Potatoes (1972).
307. ONICĂ DOINA, *The heterogeneity of Fab and Fo fragments obtained from rabbit IgG revealed by isoelectric focusing.* Rev. roum. Biochim., *7*, 287 (1970).
308. ONICĂ DOINA, *The effect of rabbit immunoglobulin G binding to an insoluble matrix (PAB—cellulose) on its capacity to react with specific pig antibodies.* Rev. roum. Biochim., *8*, 63 (1971).
309. ONICĂ DOINA, *Susceptibilitatea la hidroliză a două proteine Bence—Jones de tip* λ St. cerc. biochim., *15*, 187 (1972).
310. POPESCU ALEXANDRINA, MIOARA CÂRSTEANU, *Explorarea exocolului uterin prin exosmoza electroliţilor.* St. cerc. biochim., *8*, 221 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 149 (1965).
311. POPOV DOINA, *Fosfataza acidă şi fosforul anorganic din porumb în primele etape de creştere.* St. cerc. biochim., *12*, 377 (1969).
312. POPOV DOINA, *Acţiunea unor efectori asupra activităţii fosfatazei acide din grîu.* St. cerc. biochim., *14*, 311 (1971).
313. PRAHOVEANU ELENA, M. ŞERBAN, I. MOISA, *Activitatea şi izoenzimele lactat dehidrogenazei din lichidul alantoidian al ouălor embrionate, inoculate cu virusul gripal A (Pr. 8).* St. cerc. biochim., *13*, 313 (1970).
314. PRAHOVEANU ELENA, M. ŞERBAN, Y. COPELOVICI, *Corelaţii între efectul unor inhibitori metabolici, activitatea lactat şi succinat dehidrogenazei şi procesul de multiplicare a virusului urlian.* St. cerc. biochim., *15*, 2 (1972).
315. PRAHOVEANU ELENA, M. ŞERBAN, R. LUPU, M. GRUIA, *Efectul ATP-ului asupra activităţii lactat dehidrogenazei şi izoenzimelor sale în cursul multiplicării virusului herpetic.* St. cerc. biochim., *15*, 79 (1972).
316. RĂDULESCU SANDA, *Unele observaţii asupra acţiunii şi comportării heteroauxinei introduse în plante.* St. cerc. biochim., *2*, 189 (1959).

317. RĂDULESCU SANDA, SS. VASU, *Contribuţii la studiul nucleazelor din* Aspergillus niger. Microbiologia (Conf. naţ. microbiol. gen. apl., 4—7 dec. 1968), *1*, 281 (1970).
318. RĂDULESCU TR., *Sinteze în domeniul oxi- şi aminostilbenilor substituiţi.* Bul. Acad. R.P.R., secţia Şt. biol. agr. geol. geogr., *4*, 489 (1952).
319. RĂDULESCU TR., DITA COTARIU, *Exosmoza fosfatului anorganic din muşchi în narcoză şi mişcare pasivă.* St. cerc. biochim., *7*, 243 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 197 (1964).
320. RĂDULESCU TR., DITA COTARIU, *Acţiunea narcozei asupra nivelului fosfocreatinei din muşchi.* St. cerc. biochim., *8*, 77 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 63 (1965).
321. RĂDULESCU TR., DITA COTARIU, *The effect of denervation, narcosis and curarization on cation movements in striated muscles.* Rev. roum. Biochim., *2*, 343 (1965).
322. RĂDULESCU TR., DITA COTARIU, LORA SCOLNIC, *Fosforul anorganic şi exosmoza lui din muşchi în diferite stări de excitabilitate şi efort.* St. cerc. biochim., *7*, 97 (1964); Rev. ruom. Biochim., *1*, 89 (1964).
323. RĂDULESCU TR., H.D. SCHELL, *Unele aspecte ale metabolismului fosforic la germenii grîului de toamnă* A_{15} *în cursul iarovizării. Variaţia fosforului nucleic şi mineral.* St. cerc. biochim., *2*, 67 (1959).
324. RĂDULESCU TR., H. D. SCHELL, *Quaternäre Ammoniumsalze des Acetamido-benzal-fluorens.* Rev. roum. Chim., *15*, 1127 (1970).
325. RĂDULESCU TR., H. D. SCHELL *Mono- und Diquaternäre Ammoniumsalze des Benzal-fluorens.* Rev. roum. Chim. *15*, 1427 (1970).
326. RĂDULESCU TR., H.D. SCHELL, LORA SCOLNIC, *Synthese des 1.4—Bis-(p-trimethyl-ammonium-anilido)-antrachinondijodids und -dichlorids.* Rev. roum. Chim., *17* (1972).
327. RĂDULESCU TR., LORA SCOLNIC, *Exosmoza fosfatului anorganic în diferite stări funcţionale ale muşchiului.* St. cerc. biochim., *7*, 237 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 191 (1964).
328. RĂDULESCU TR., S.S. VASU, *Unele săruri de amoniu cuaternar derivate de la 2-amino-fluoren şi 2,7-diaminofluoren.* Com. Acad. R.P.R., *8*, 793 (1958); Rev. Chim. Acad. R.P.R., *3*, 261 (1958).
329. ROSENZWEIG BIANCA, LIA ARNET, *Acţiunea ureei asupra amilazelor de diferite origini.* Com Acad. R.P.R., *5*, 1473 (1955).
330. SARMANIOTI CORINA, C. VIOR, C. CONSTANTINESCU, *Fracţionarea cromatografică a globulinelor serice şi colostrale de cal şi izolarea imunoglobulinelor G şi G(T).* St. cerc. biochim., *15*, 201 (1972).
331. SAUVARD S., D. WINTER, D. TĂNĂSESCU, C. STĂNESCU, I. NIŢELEA, *Cercetări asupra acţiunii energizante a unor aminoacizi. Nota II. Influenţa glutamatului compus asupra eforturilor repetate la şoarece.* St. cerc. fiziol., *12*, 311, 1967.
332. SCHELL H.D., *Sinteza clorurii betainil-iso-butilaminei şi a clorurii betainil-iso-amil-aminei.* Com. Acad. R.P.R., *5*, 1071 (1955).
333. SCHELL H. D., *Interacţiunea unor substanţe curarizante fluorescente cu proteinele serice.* St. cerc. biochim., *4*, 505 (1961).
334. SCHELL H.D., *Săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben.* St cerc. biochim., *4*, 681 (1961).
335. SCHELL H.D., *Comportarea proteinelor sanguine şi musculare faţă de unele substanţe curarizante fluorescente derivate de la stilben.* St. cerc. biochim., *4*, 365 (1961)
336. SCHELL H.D., *Interacţiunea unor săruri cuaternare de amoniu fluorescente cu proteinele musculare.* St. cerc. biochim., *6*, 545 (1963).
337. SCHELL H.D., *Acţiunea antiacetilcolinică şi anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben.* St. cerc. biochim., *6*, 61 (1963).
338. SCHELL H.D., *Natura legăturilor în complecşii formaţi între proteine şi sărurile cuaternare de amoniu.* St. cerc. biochim., *10*, 337 (1967).
339. SCHELL H.D., *Comportarea proteinelor sarcoplasmatice faţă de unele săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben în filogenie.* St. cerc., biochim. *13*, 183 (1970).
340. SCHELL H.D., TR. BENŢIA, *Interacţiunea proteinelor cerebrale cu unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben.* St. cerc. biochim., *16* (1973).
341. SCHELL H. D., MIOARA CÂRSTEANU, *Cromatografia în coloană pe schimbători de ioni bazici derivaţi de la agaroză a proteinelor musculare în filogenie.* St. cerc. biochim., *15*, 211 (1972).
342. SCHELL H.D., V. GHEŢIE, *Cuplarea clorurii de 1-metil-aminonaftalin-5-sulfonil cu proteinele serice şi purificarea conjugatelor obţinute.* St. cerc. biochim., *7*, 249 (1964).

343. SCHELL H.D., V., GHEȚIE *Elektrophorese und Immunoelektrophorese von Eiweissstoffen in DEAE-Agarosegelen.* Rev. roum., Biochim., *5*, 77 (1968).
344. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Utilizarea agarozei legate încrucișat în cromatografia de excludere moleculară.* St. cerc. biochim., *11*, 69 (1968).
345. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Agarosederivate mit Anwendung in Gelfiltration, Säulenchromatographie und Gelelektrophorese.* Rom. Biochem. Letters, *1*, 103 (1970).
346. SCHELL H. D., V. GHEȚIE, *Trocknung von granulierten und perlförmigen Agarose-Ionenaustauscher-Gelen.* Rev. roum. Biochim., *8*, 351 (1971).
347. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Neue saure und basische Agarose-Ionenaustauscher.* Rev. roum. Biochim., *9*, 165 (1972).
348. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, SILVIA MIHĂESCU, *Chromatographie von Humanserumproteinen an DEAE-Agarose und Verteilung der Immunoglobuline im Elutionsdiagramm.* Rev. roum. Biochim., *5*, 295 (1968).
349. SCHELL H.D., D. TĂNĂSESCU, *Die biochemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der mit fluoreszierenden quaternären Ammoniumsalzen des Stilbens behandelten sarkoplasmatischen Muskeleiweissstoffe.* Rev. roum. Biochim., *6*, 163 (1969).
350. SCOLNIC LORA, *Substitution de l'azote liquide par l'hydroxyde de sodium comme agentde fixation, en vue du dosage du phosphate inorganique libre des muscles.* Rev. roum. Biochim., *2*, 385 (1965).
351. SCOLNIC LORA, *Exosmoza substanțelor reducătoare în diferite stări funcționale ale mușchiului.* St. cerc. biochim., *9*, 299 (1966).
352. SCOLNIC LORA, *Exosmoza substanțelor reducătoare din mușchiul gastrocnemian de broască în diferite condiții experimentale.* St. cerc. biochim., *11*, 305 (1968).
353. SCOLNIC LORA, *Unele aspecte ale exosmozei fosforului anorganic din mușchiul gastrocnemian de broască în narcoză.* St. cerc. biochim., *12*, 91 (1969).
354. SCOLNIC LORA, *Influența ionului de rubidiu asupra conținutului în acid piruvic, în apa totală, precum și asupra exosmozei acidului piruvic din mușchiul sartorius de broască* St. cerc. biochim., *14*, 319 (1971).
355. SCOLNIC LORA, *Influența ionului de potasiu asupra conținutului în acid piruvic, apă totală și asupra exosmozei acidului piruvic din mușchiul sartorius de broască.* St. cerc. biochim., *15*, 93 (1972).
356. SCOLNIC LORA, *Influența clorurii de potasiu asupra permeabilității, conținutului în apă totală și acid lactic al mușchiului sartorius și gastrocnemian de broască.* St. cerc. biochim., *15*. 289 (1972).
357. SCOLNIC LORA, *Influența clorurii de rubidiu asupra permeabilității, conținutului în apă totală și acid lactic al mușchiului sartorius și gastrocnemian de broască.* St. cerc. biochim., *16*, (1973).
358. SIMON Z., V. GHEȚIE, *Molecular size and specificity in immunology.* Rev. roum. Biochim., *8*, 261 (1971).
359. SOICHER LORA, *Permeabilitatea membranei lichide alcool butilic-apă pentru roșu neutru.* St. cerc. biochim., *1*, 381 (1958).
360. SOICHER LORA, *Comportarea coacervatului gelatină-gumă arabică în prezența lipazei.* St. cerc. biochim., *2*, 321 (1959).
361. SULICĂ A., GR. GHYCA, V. GHEȚIE, *Induction of antibody formation in rabbit spleen cells with a nucleoprotein extracted from immune donor spleen.* Rev. roum. Biochim. *5*, 145 (1968).
362. ȘANTA N., C. MEDEȘAN, *Observațiuni asupra metodei cordului izolat de broască.* Rev. Univ. „C. I. Parhon", București, *2*, 165 (1953).
363. ȘANTA, N., C. MEDEȘAN, *Cercetări asupra complexului funcțional mio-neural-visceral.* Med. int., *6*, 887 (1959).
364. ȘANTA, N., C. MEDEȘAN, *Un procedeu experimental cu dublu control pentru cercetări asupra mușchilor netezi.* Com. Acad. R.P.R., *9*, 1165 (1959).
365. ȘANTA N., C. MEDEȘAN, *Observații asupra automatismului stomacului izolat de broască.* St. cerc. biol., seria Biol. anim., *12*, 76 (1960).
366. ȘANTA N., C. MEDEȘAN, *Cercetări asupra motilității spontane și a reactivității intestinului de crap.* Com. zool. (1957)—1959) a Soc. de șt. nat. și geogr. din R.P.R., 39 (1960).
367. ȘANTA N., C. MEDEȘAN, *Action de la novocaïne sur les muscles lisses.* L'Information méd. Roum., *5*, 271 (1961).
368. ȘANTA N., C. MEDEȘAN, *Influence de la température sur la motilité automatique et sur la reactivité de quelques muscles lisses.* Rev. roum. Biol., *7*, 229 (1962).
369. ȘANTA N., C. MEDEȘAN, *Cercetări asupra rolului fiziologic al componentei colinergice din mușchii netezi.* Anal. Univ. Buc., seria Șt. nat., *15*, 109 (1966).

370. ŞELARIU CECILIA, *Studiul comparativ al antigenicităţii proteinelor solubile din mitocondriile şi citoplasma creierului de şobolan.* St. cerc. biochim., *7*, 425 (1964); Rev. roum. Biochim., *2*, 79 (1965).
371. ŞELARIU CECILIA, *Antigenecity of mitochondrial water-soluble proteins and of cell-sap proteins in rat liver.* Rev. roum. Biochim., *2*, 357 (1965).
372. ŞELARIU CECILIA, *Prezenţa transaminazei aspartice citoplasmatice în preparatele mitocondriale ale creierului de şobolan.* St. cerc. biochim. *10*, 341 (1967).
373. ŞELARIU CECILIA, *Forme multiple ale izotransaminazei aspartice mitocondriale din ficatul de şobolan.* St. cerc. biochim., *11*, 75 (1968).
374. ŞELARIU CECILIA, V. GHEŢIE, SILVIA MIHĂESCU, *Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor şi auticorpilor fluorescenţi de iepure.* St. scerc. biochim., *8*, 89 (1965).
375. ŞELARIU CECILIA, SILVIA MIHĂESCU, *Activitatea fosfatazelor şi colinesterazelor din serul sanguin al cîinilor intoxicaţi cronic cu azotat de plumb.* Com. Acad. R.P.R. *7*, 45 (1957).
376. ŞELARIU CECILIA, SILVIA MIHĂESCU, *Heteroauxina şi ATP, activitatea ATP-azică şi fosfatazică din ficat.* St. cerc. biochim., *2*, 425 (1959).
377. ŞELARIU CECILIA, SILVIA MIHĂESCU, *Cercetarea comparativă a proteinelor solubile din mitocondriile de creier şi ficat de şobolan,* St. cerc. biochim. *4*, 349 (1961).
378. ŞELARIU CECILIA, SILVIA MIHĂESCU, *Repartiţia transaminazelor pe fracţiunile electroforetică ale proteinelor solubile din mitocondriile de creier şi ficat de şobolan.* St. cerc. biochim., *5*, 97, (1962).
379. ŞERBAN M., *Cercetarea electroforetică a proteinelor solubile din creier în filogenie.* St. cerc. biochim., *2*, 309 (1959).
380. ŞERBAN M., *Comportarea proteinelor cerebrale acvosolubile în procesul de salifiere şi desalifiere.* St. cerc. biochim., *4*, 103 (1961).
381. ŞERBAN M., *Acţiunea unor săruri cuaternare de amoniu cu activitate curarizantă asupra comportării polarografice a cisteinei.* St. cerc. biochim., *1*, 369 (1958); Ztschr. für Chem., *8*, 258 (1962).
382. ŞERBAN M., *Polarografia proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie.* St. cerc. biochim., *7*, 267 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 217 (1964).
383. ŞERBAN M., *Aminoacizii liberi din creier în filogenie.* St. cerc. biochim., *7*, 433 (1964); Rev. roum. Biochim., *1*, 335 (1964).
384. ŞERBAN M., *Filogenia proteinelor cerebrale acvosolubile şi fracţionarea lor chimică.* St. cerc. biochim., *6*, 383 (1963).
385. ŞERBAN M., *La cromatographie des protéines sarcoplasmatiques musculaires par gradient discontinuu de concentration.* Rev. roum. Biochim., *2*, 387 (1965).
386. ŞERBAN M., *Studiul comparativ al fosfolipidelor din musculatura striată şi netedă prin cromatografie în strat subţire.* St. cerc. biochim., *10*, 155 (1967).
387. ŞERBAN M., *Les isoenzymes de la lactate déhydrogénase dans les muscles striés et lisses.* Rev. roum. Biochim., *4*, 211 (1967).
388. ŞERBAN M., *Biochimia comparată a proteinelor cerebrale.* St. cerc. biochim., *10*, 287 (1970),
389. ŞERBAN M., *Comparative biochemistry of isoenzymes.* Roum. Biochem. Letters, *1*, 87 (1970).
390. ŞERBAN M., *Izoenzimele izocitrat dehidrogenazei şi glutamat dehidrogenazei din creier în filogenie.* St. cerc. biol., seria Zool., *22*, 563 (1970).
391. ŞERBAN M., *Muscle and serumaspartate aminotransferase and its isoenzymes during carbon tetracloride intoxication and under the action of cortisol.* Rev. roum. Biochim., *8*, 271 (1971).
392. ŞERBAN M., *Activitatea specifică în funcţie de pH şi comportarea la inhibiţia termică şi cu uree a malat dehidrogenazei din creier în seria vertebratelor.* St. cerc. biochim., *14*, 85 (1971).
393. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Comparative biochemistry of isoenzymes. II. Brain lactic dehydrogenase isoenzymes in the phylogeny of vertebrates* Rev. roum. Biochim., *5*, 325 (1968).
394. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Biochimia comparată a izoenzimelor. IV. Izoenzimele lacticodehideogenazei din muşchii striaţi în seria vertebratelor.* St. cerc. biochim., *12*, 173 (1969).
395. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Comparative biochemistry of isoenzymes. V. Brain cytoplasmic and mitochondrial malat dehydrogenases in the phylogeny of vertebrates.* Rev. roum. Biochim., *7*, 157 (1970).
396. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Biochimia comparată a izoenzimelor. X. Proteinele cerebrale solubile în filogenie şi localizarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei, aldolazei, malat dehidrogenazei şi aspartat aminotransferazei.* St. cerc. biochim., *13*, 417 (1970).

397. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Proteinele solubile din mușchii scheletici ai diferitelor vertebrate și localizarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei, aldolazei, malat dohidrogenazei și aspartat-aminotransferazei.* St. cerc. biol., seria Zool., *22*, 473 (1970).
398. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *La biochimie comparée des isoenzymes. VI. Izoenzymes des deshydrogénases maliques des muscles squélettiques des vertébrés.* Rev. roum. Biol., série Zool., *15*, 181 (1970).
399. M. ŞERBAN, DITA COTARIU, *Biochimia comparată a izoenzimelor. XI. Izoenzimele malat-dehidrogenazelor și lactat-dehidrogenazei din mușchiul neted la unele specii de vertebrate.* St. cerc. biochim., *14*, 93 (1971).
400. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Comportarea malat dehidrogenazelor din mușchii netezi de diferite vertebrate la variația pH-ului și la denaturarea termică și cu uree.* St. cerc. biochim., *14*, 197 (1971).
401. ŞERBAN M., DITA COTARIU, CORINA IORDACHE, *Modificări biochimice post-mortem în mușchiul de porc și semnificația lor.* St. cerc. biochim., *15*, 219 (1972).
402. ŞERBAN M., S.B. CURRI, *Chemical characterization of RNA extracted from human and mammalian organs with special reference to aminoacids.* La Ricerca Scientifica (Roma), *35*, 758 (1966).
403. ŞERBAN M., D. MOȚET—GRIGORAŞ, *Determinarea polarografică a vitaminei C în legume provenite din semințe stimulate și nestimulate (Notă preliminară).* Com. Acad. R.P.R., *12*, 1025 (1957).
404. ŞERBAN M., D. MOȚET—GRIGORAŞ, *Polarograficeskoe opredelenie vitamina C v ovasceoh iz sitmulirovanih i nestimulirovanih semian.* Rev. chim., *2*, 275 (1958).
405. ŞERBAN M., ELENA PRAHOVEANU, *Izoenzimele și activitatea lactat-dehidrogenazei din serul de iepuri inoculați cu dermovaccin.* St. cerc. biochim., *13*, 79 (1970).
406. ŞERBAN M., MARIANA STAN, *Efectul administrării de estrogen asupra lactat dehidrogenazei hepatice și serice, precum și asupra izoenzimelor sale în intoxicația cronică experimentală cu tetraclorură de carbon.* St. cerc. biochim., *14*, 327 (1971).
407. ŞERBAN M., MARGARETA ŞERBAN, *La biochimie comparée des isoenzymes. VII. Les isoenzymes de l'aspartate aminotransférase du cerveau et des muscles dans la phylogénie des vertébrés.* Rev. roum. Biochim., *7*, 231 (1970).
408. ŞERBAN M., MARGARETA ŞERBAN, *Efectul cortizolului asupra lactat dehidrogenazei și a izoenzimelor sale din ficat și ser în intoxicația experimentală acută și cronică cu tetraclorură de carbon.* St. cerc. biochim., *14*, 203 (1971).
409. ŞERBAN M., MARGARETA ŞERBAN, *Rabbit serum lactate dehydrogenase and its isoenzymes in experimental hepatitis and nephropathy as well as under the action of some enzyme inhibitors* in vivo. Rev. roum. Biochim., *8*, 159 (1971).
410. ŞERBAN M., D. TĂNĂSESCU, *Cercetarea comparativă a proteinelor sarcoplasmatice din musculatura striată și netedă.* St. cerc. biochim., *6*, 559 (1963).
411. ŞERBAN M., D. TĂNĂSESCU, S.S. VASU, *Contribuții la aplicarea micrometodei Lowry în condițiile evaluării fracțiunilor proteice eluate prin gradient de concentrație în clorură de potasiu.* St. cerc. biochim., *6*, 115 (1963).
412. TĂNĂSESCU D. , *Acizii lactic și piruvic din mușchii gastrocnemieni de broască în contracția izotonică.* St. cerc. biochim., *7*, 285 (1964) ; Rev. roum. Biochim., *1*, 233 (1964) .
413. TĂNĂSESCU D., *Aerobic glycolysis and phosphorylase a and b and aldolase, during muscular contraction.* St. cerc. biochim., *8*, 325 (1965); Rev. roum. Biochim., *2*, 269 (1965).
414. TĂNĂSESCU D., *Variation of the lactic acid after electrical stimulation of frog gastrocnemius treated with monoiodacetic acid natrium fluoride or l-fluoro—2.4-dinitro-benzene.* Rev. roum. Biochim., *2*, 379 (1965).
415. TĂNĂSESCU D., *Aminoacizii liberi intracelulari și participarea lor în metabolismul muscular.* St. cerc. biochim., *9*, 367 (1966).
416. TĂNĂSESCU D., *Separation of sarcoplasmatic proteins of frog gastrocnemius on DEAE—Sephadex and their ultraviolet absorption spectra.* Rev. roum. Biochim., *4*, 143 (1967).
417. TĂNĂSESCU D., TR. BENȚIA, *Separarea prin cromatografie în strat subțire de silicagel a compușilor imidazolici din mușchii și ficatul de șobolan.* St. cerc. biochim., *11*, 421 (1968).
418. TĂNĂSESCU D., TR. BENȚIA, *Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor sarcoplasmatice tratate cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen.* St. cerc. biochim., *13*, 172 (1970).
419. TĂNĂSESCU D., C. MEDEŞAN, *Activitatea lactat dehidrogenazei din mușchii de broască perfuzați cu 2,4-dinitrofenol și stimulați electric.* St. cerc. biochim., *14*, 333 (1971)

420. TĂNĂSESCU D., NATALIA MOLDOVEANU, *Electroforeza proteinelor sacroplasmatice musculare în gel de poliacrilamidă.* St. cerc. biochim., *11*, 313 (1968).
421. TĂNĂSESCU D., NATALIA MOLDOVEANU, *Kinetic study of 2.4-Dinitrophenol inhibition upon frog muscle purified glycogen phosphorylase.* Rev. roum. Biochim., *7*, 313 (1970).
422. TĂNĂSESCU D., NATALIA MOLDOVEANU, C. MEDEȘAN, *The behaviour of M_4 and H_4-Lactate dehidrogenase isoenzymes, purified from muscle and rabbit heart against 2.4-Dinitrophenol.* Rev. roum. Biochim., *9*, 79 (1972).
423. TĂNĂSESU D., TR. RĂDULESCU, TR. BENȚIA, *Effect of potassium and calcium ions on the glycolysis occurring in the frog gastrocnemius.* Rev. roum. Biochim., *8*, 343 (1971).
424. TĂNĂSESCU D., H.D. SCHELL, *Die Hemmung der Glykolyse aus dem Ratten-Gastrocnemius durch Trimethyl-ammoniumstilben-chlorid.* Rev. roum. Biochim., *7*, 69 (1970).
425. VASU S.S., *Comportarea succindehidrazei și respirația endogenă din omogenatele de creier de șobolan în prezența emulsiilor de lecitină.* Com Acad. R.P.R., *5*, 529 (1955).
426. VASU S.S., *Comportarea coacervatelor proteino-pectice în prezența poligalacturonazei.* St. cerc. biochim., *4*, 517 (1961).
427. VASU S.S., *Enzime pectolitice din Aspergillus niger. I. Producerea poligalacturonazelor în medii de cultură sintetice.* St. cerc. biochim., *6*, 71 (1963).
428. VASU S.S., *Pectolytic enzymes of Aspergillus niger. II. Intracellular distribution of polygalacturonase, pectinmethylesterase and pectintranseliminases.* Rev. roum. Biochim., *4*, 67 (1967).
429. VASU S.S., *Pectolytic enzymes of Aspergillus niger. III. The action of pectin and same pectic degradation substances in the formation of polygalacturonases.* Rev. roum. Biochim. *4*, 219 (1967).
430. VASU S.S., *ADN din unele specii de Aspergillus niger și acțiunea lui asupra altor specii din același gen.* Primul Simpozion Național „Acizii nucleici biologic activi", Centr. doc. Acad. R.S.R., 1967, p. 188.
431. VASU S.S., *Dispozitiv pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă utilizate în electroforeza acizilor nucleici și a proteinelor.* St. cerc. biochim., *12*, 393 (1969).
432. VASU S.S., *Fractionation of nucleic acids from* Aspergillus niger *by electrophoresis în agarose gel.* Rev. roum. Biochim., *6*, 75 (1969).
433. VASU S.S., *Contribuții la studiul enzimelor pectolizice din* Aspergillus niger. Microbiologia (Conf. nat. microbiol. gen. apl., 4—7 dec. 1968), *1*, 288 (1970).
434. VASU S.S., *Analiza electroforetică a acizilor nucleici în gel de agaroză și poliacrilamidă*, St. cerc. inframicrobiol., *22*, 459 (1971).
435. VASU S.S., *Hidroliza enzimatică a acizilor nucleici.* St. cerc. inframicrobiol., *22*, 539 (1971).
436. VASU S.S., *Evidențierea activității ribonucleazelor în urma electroforezei în plăci de gel de poliacrilamidă.* St. cerc. inframicrobiol., *22*, 563 (1971).
437. VASU S.S., MIOARA CÂRSTEANU, CORINA SARMANIOTI, *Acțiunea benzedinei și medinalului asupra activității unor enzime din țesuturile animale*, St. cerc. biochim, *4*, 265 (1961).
438. VASU S.S., ȘT. HULEA, *Electrophoresis of cytoplasmic ribonucleic acids from* Aspergillus niger, *fractionated by ion-exchanger chromatography and gel filtration.* Rev. roum. Biochim., *8*, 167 (1971).
439. VASU S.S., ȘT. HULEA, VIORICA LAZĂR, *The ribonucleases of the species groups of genus* Aspergillus. Rev. roum. Biochim., *9*, 179 (1972).
440. VASU S.S., ȘT. HULEA, SANDA RĂDULESCU, *Multiple molecular forms of ribonucleases from* Aspergillus niger *and their intracellular and extracellular distribution.* Rev. roum. Biochim., *8*, 351 (1971).
441. VASU S.S., SANDA RĂDULESCU, *Contribuții la studiul acizilor nucleici din* Aspergillus niger. Primul Simpozion național „Acizi nucleici biologic activi", Centr. doc. Acad. R.S.R., 1967, p. 192.
442. VASU S.S., SANDA RĂDULESCU, Acizii nucleici din sporii de *Aspergillus niger*. Microbiologia (Conf. nat. microbiol. gen. apl., 4—7 dec. 1968), *1*, 294 (1970).
443. VASU S.S., SANDA RĂDULESCU, *Acizii nucleici din celulele hifale și sporii de* Aspergillus niger. St. cerc., biochim., *14*, 339 (1971).
444. WINTER D., S. SAUVARD, C. STĂNESCU, I. NIȚELEA, D. TĂNĂSESCU, *Cercetări asupra acțiunii energizante a unor aminoacizi. I. Modificarea timpului de înnot și a lactacidemiei de efort la șoarece.* St. cerc. fiziol., *12*, 207 (1967).
445. ZAHARIA C., H.D. SCHELL, *Influența configurației* cis *și* trans *la unele săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben asupra blocării transmisiei neuromusculare.* Rev. roum. Physiol, *9*., 371 (1972).

446. ZAHARIA ODETTE, *Variația activității esterazice în extractele semințelor grîului de toamnă A_{15} în cursul iarovizării.* Com Acad. R.P.R., *5*, 1177 (1955).
447. ZAHARIA ODETTE, *Pătrunderea ionilor de brom în semințele grîului de toamnă A_{15} în cursul stimulării cu bromură de potasiu.* St. cerc. biochim., *1*, 161 (1958).
448. ZAHARIA ODETTE, *Influența acidului ribonucleic asupra acumulării substanțelor proteice în plante.* St. cerc. biochim., *3*, 201 (1960).
449. ZAHARIA ODETTE, *Accelerarea oxidării glicocolului prin sistemul polifenoloxidazic din floarea-soarelui în prezența prolinei.* St. cerc. biochim., *4*, 235 (1961).
450. ZAHARIA ODETTE, *Oxidarea unor aminoacizi în prezența sistemului polifenoloxidazic din plante.* St. cerc. biochim., *5*, 103 (1962).

II. REFERATE

451. CĂPÎLNĂ S., M. ȘERBAN, *Al V-lea Congres internațional de biochimie.* St. cerc. biochim. *5*, 121 (1962).
452. COTARIU DITA *Aspecte moleculare ale specificității biochimice.* Progr. șt., *4*, 554 (1968).
453. COTARIU DITA , *Izoenzime musculare.* St. cerc. biol., seria Zool., *22*, 125 (1970).
454. COTARIU DITA M. ȘERBAN, *Unitatea biochimică a lumii vii.* Progr. șt., *5*, 587 (1969).
455. GHEȚIE V., *Sinteza proteinelor de rezervă în cursul coacerii semințelor.* St. cerc. biochim., *9*, 311 (1966).
456. GHEȚIE V., *Degradarea proteinelor de rezervă din sămînță în procesul germinativ.* St. cerc. biochim., *9*, 91 (1966).
457. GHEȚIE V., *Organogeneza și biosinteza proteinelor specifice la plantele superioare.* St. cerc. biochim., *10*, 357 (1967).
458. GHEȚIE V., *Localizarea situsurilor de combinare în molecula anticorpilor*, cap. în *Progrese recente în imunologie*, București, Edit. medicală, 1969, p. 67.
459. IORDACHE CORINA, *Rolul fosfagenului în procesele biochimice care stau la baza fenomenului de contracție musculară.* St. cerc. biochim., *8*, 473 (1965).
460. MACOVSCHI E., *Razvitie biokhimyi Rumynii.* Vest. Akad. Nauk SSSR, *7*, 91 (1955).
461. MACOVSCHI E., *Institut Biokhimii Akademii Nauk RNR.* Biuleten nauchinoi informatzii, *2*, (1958).
462. MACOVSCHI E., *Nekotorye sootnoshenia mezdu kaotzervatami i fermentami vozniknovenie zhizni na zemle.* Akad. Nauk SSSR, 441, (1959).
463. MACOVSCHI E., *Metoda capilară și aplicarea ei în biochimia plantelor*, în *Hommage à Tr. Săvulescu*, București, Edit. Acad. R.P.R., (1959, p. 1 073.
464. MACOVSCHI E., *Materia vie și unele aspecte cibernetice ale structurii ei*, în *Omagiu lui C.I. Parhon*, București, Edit. Academiei 1966 p, 281.
465. MACOVSCHI E., *Un nou punct de vedere în problema originii materiei vii.* Progr. șt., *7*, 221 (1971).
466. MILCU ȘT., CL. NICOLAU, M. ȘERBAN, *Metode moderne de investigare în biologie și medicină*, în *Metode noi și probleme de perspectivă ale cercetării științifice*, București, Edit. Academiei, 1971, p. 103.
467. RĂDULESCU, TR., *Substanțe curarizante de sinteză. Unele relații dintre structura și activitatea lor.* St. cerc. biochim., *3*, 361 (1960).
468. SCHELL, H.D., *Relația dintre structura chimică și activitatea biologică*, cap. în *Probleme actuale de chimie*, București, Edit. didactică și pedagogică, 1964, p. 199
469. SCHELL, H.D., *Acizii nucleici. Compoziția, structura și rolul lor biologic*, cap. în *Probleme actuale de chimie*, București, Edit. didactică și pedagogică, 1968, p. 153.
470. SCHELL H.D. V. GHEȚIE, *Imunoelectroforeza în geluri de agaroză schimbătoare de ioni (DEAE— și CM-agaroză).* Doc. Haemat., *2*, 41 (1968).
471. ȘERBAN M., *Proteinele cerebrale.* St. cerc. biochim., *10*, 69 (1967).
472. ȘERBAN M., *Biochimia comparată a protidelor.* Progr. st., *4*, 151 (1969).
473. ȘERBAN N., *Evoluția filogenetică a protidelor.* St. cerc. biol., seria Zool., *21*, 359 (1969).
474. ȘERBAN M., *Metodologia experimentală în cercetarea biochimică*, în *Metode noi și probleme de perspectivă ale cercetării științifice*, București, Edit. Academiei, 1971 p. 173.
475. ȘERBAN, M., *Preocupări actuale și tendințe în biochimia comparată.* Natura, *2*, 20 (1971).
476. ȘERBAN M., *Contributions à la biochimie comparée des differents types de muscle*, în *Automatisation et biol. prospective*, Nancy, 1972.

477. ŞERBAN M., *Orientări şi tendinţe în enzimalogia comparată.* St. cerc. biochim., *16*, (1973),
478. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Bazele moleculare ale contracţiei musculare.* St. cerc. biol. seria Zool., *22*, 59 (1970).
479. TĂNĂSESCU D., *Structura şi funcţiile formaţiunilor subcelulare.* Progr. şt., *2*, 17 (1966).
480. TĂNĂSESCU D., *Glicoliza şi reglarea sa enzimatică în cursul contracţiei musculare.* St. cerc. biochim., *9*, 207 (1966).
481. TĂNĂSESCU D., *Proteinele alosterice şi rolul lor în procesele de reglare metabolică.* Progr. şt., *6*, 58 (1970).

III. BIOGRAFII

482. MEDEŞAN C., *Profesorul Ion Athanasiu.* St. cerc. biochim., *3*, 341 (1960).
483. MIHĂESCU SILVIA, *Profesorul Aurel D. Craifăleanu.* 1884 — 1928. St. cerc. biochim., *2*, 223 (1959).
484. ŞELARIU CECILIA, *Dimitrie Călugăreanu. 1868—1937.* St. cerc. biochim., *2*, 467 (1959).

IV. CĂRŢI

485. GHETIE V., V. MICUŞAN, *Analiza imunochimică*, Bucureşti, Edit. Academiei, 1966, 370 p.
486. MACOVSCHI E., *Biostructura*, Bucureşti, Edit. Academiei, 1969, 258 p.
487. MACOVSCHI E., *Natura şi structura materiei vii*, Bucureşti, Edit. Academiei, 1972, 250 p.
488. MIHĂILESCU V., *Proteinele plasmatice. Biochimie, fiziopatologie clinică*, Bucureşti, Edit. Acad. R.P.R., 1953, 88 p.
489. MIHĂILESCU V., *Introducere în biochimia bolilor de piele.* Bucureşti Edit. Acad. R.P.R. 1956, 88 p.
490. ŞERBAN M., *Biochimia comparată şi evoluţia moleculară*, Bucureşti Edit. Academiei, 1973.
491. ŞERBAN M., DITA COTARIU, *Biochimia contracţiei musculare*, Bucureşti, Edit. Academiei 1970, 240 p.

V. CĂRŢI ŞI BROŞURI DE POPULARIZARE A ŞTIINŢEI

492. GHEŢIE V., *Compoziţia chimică a materiei vii*, Bucureşti, Edit. ştiinţifică, 1965, 62 p.
493. GHEŢIE V., *Fără proteine nu există viaţă*, Bucureşti, Edit. ştiinţifică, 1966, 126 p.
494. GHEŢIE V., *Anticorpii în acţiune*, Bucureşti, Ed. enciclopedică română, 1971, 227 p.
495. GRUIA MARIA, S.S. VASU, *Cataliza şi biocataliza în chimia modernă*, Bucureşti, Edit. ştiinţifică, 1967, 354 p.
496. E. MACOVSCHI, *Apariţia vieţii pe Pământ*, Bucureşti, Edit. Ministerului Învăţământului şi Culturii, 1960, 16 p.
497. MACOVSCHI E., *Wie entstand das Leben?* Leipzig-Jena-Berlin, Urania-Verlag, 1961, 32 p.
498. MACOVSCHI E., *Cum se transformă hrana în putere.* Bucureşti, Consiliul pentru răspîndirea cunoştiinţelor cultural-ştiinţifice, 1962, 32 p.
499. VASU S.S., *Viaţa şi arderea fără foc*, Bucureşti, Edit. ştiinţifică, col. „Orizonturi", 1966, 78 p.

VI. INVENŢII

500. GHEŢIE V., D. MOŢET—GRIGORAŞ, H. D. SCHELL, *Derivaţi de sinteză ai agarozei şi procedeu de obţinere a lor.* Invenţie, brevetată în R.S. România nr. 48 707 (1966); Franţa nr. 1 527 883 (1968); Anglia nr. 1 175 897 (1969); Statele Unite nr. 3 507 851 (1970).

501. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Schimbători anionici pe bază de agaroză.* Invenție, brevetată în R.S. România nr. 52 869 (1971); Franța nr. 6 909 614 (1969); Anglia nr. 1 228 067 (1971).
502. GHEȚIE V., H. D. SCHELL, *Schimbători cationici derivați de la agaroză și procedeu de obținere a lor.* Invenție, brevetată în R.S. România nr. 52 786 (1971); Franța nr. 6 909 231 (1969); Anglia nr. 1 222 949 (1971); Statele Unite nr. 3 625 939 (1971).
503. MACOVSCHI E., *Produs pentru sămăluirea pieilor.* Brevet de invenție nr. 47 026, dosar nr. 41 431 (22 febr. 1957).
504. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Derivați de sinteză ai agarozei și procedeu de obținere a lor.* Invenție, perfecționarea invenției nr. 48 707 (1966), înregistrată la OSIM, dosar nr. 5 559/55 792 (1968).
505. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Schimbători de ioni bazici derivați de la agaroză.* Invenție, brevetată în R.S. România nr. 52 787 (1971); Franța nr. 6 909 613 (1969); Anglia nr. 1 228 066 (1971); Elveția nr. 515 064 (1971).
506. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Schimbători de ioni acizi derivați de la agaroză și procedeu de obținere a lor.* Invenție, brevetată în R.S. România nr. 52 785 (1971); Franța nr. 6 909 228 (1969); Anglia nr. 1 228 065 (1971).
507. SCHELL H.D., V. GHEȚIE, *Procedeu de trecere în stare uscată a gelurilor granulate sau perlate pe bază de agaroză.* Invenție, înregistrată la OSIM nr. 63 237 (1971).

VII. INOVAȚII

508. ȘERBAN M., *Realizarea unui sistem simplu și accesibil de efectuare a cromatografiei pe cromatoplăci tip Kodak.* Inovație, certificat nr. 7 (1968).
509. ȘERBAN M., *Metodă modificată pentru histocromatografie în strat subțire.* Inovație, certificat nr. 7 (1968).

VIII. PROTOCOALE

510. GHEORGHE VICTORIA, *Determinarea activității catalazei din cartofi.* Încheiat la 25 mai 1953.
511. GHEORGHE S.D., H.D. SCHELL, C. MEDEȘAN, *Sinteza succinilcolinei (diclorura).* Încheiat la 1 sept. 1956.
512. GHEORGHE S.D., H. D. SCHELL, C. MEDEȘAN, MARIA STOICA *Sinteza triiodurii de 1,2,3-tris-(2-trietil-amoniu-etoxi)-benzen (Flaxedil).* Încheiat la 31 ian. 1957.
513. IORDACHE CORINA, *Determinarea activității acetaldehidrazei din cartofi.* Încheiat în 1953.
514. MACOVSCHI E., VICTORIA ALEXANDRESCU, S. VASU, VIORICA ELEFTERESCU, H. SCHELL, MIOARA CÂRSTEANU, LILICA BOTOȘENEANU, SANDA RĂDULESCU, IRINA CORNOIU, DOINA POPOV, IOANA HAGIMA-CĂLIN, F. MIHĂILESCU, ȘT. HULEA, *Studiul evoluției biostructurii unor legume și fructe în perioada depozitării în vederea găsirii metodelor adecvate pentru prelungirea duratei de păstrare.* Încheiat la 1 dec. 1970.
515. MACOVSCHI E., VICTORIA ALEXANDRESCU, S. VASU, VIORICA ELEFTERESCU, H. SCHELL, MIOARA CÂRSTEANU, LILICA BOTOȘENEANU, SANDA RĂDULESCU, IRINA CORNOIU, DOINA POPOV, IOANA HAGIMA-CĂLIN, F. MIHĂILESCU, ȘT. HULEA, *Rolul biostructurii în rezistența plantelor față de boli și modificările acesteia sub influența unor tratamente cu pesticide.* Încheiat la 15 nov. 1971.
516. PRETORIAN CRISTINA, *Determinarea activității polifenoloxidazei din cartofi.* Încheiat la 25 mai 1953.
517. SARMANIOTI CORINA, *Izolarea pectinelor din tulpinile de in și cînepă.* Încheiat în 1955.
518. ȘERBAN M., *Sporirea conținutului în vitamină C și a producției de tomate.* Depus la Ministerul Agriculturii la 1 dec. 1969.
519. ȘERBAN M., DITA COTARIU, CORINA IORDACHE, NATALIA MOLDOVEANU, TR. BENȚIA, *Studiul biochimic privind comportarea polifosfaților indigeni și de*

import în saramură și carne în cursul procesului tehnologic de fabricare a semiconservelor de șuncă. Încheiat la 24 apr. 1972.

520. VASU S., M. ȘERBAN, DITA COTARIU, ȘT. HULEA, *Cercetarea dinamică a activității unor enzime din fructele de cătină albă.* Încheiat la 24 apr. 1972.

IX. TEZE DE DOCTORAT

521. CÂRSTEANU MIOARA, *Exosmoza electroliților din piele și exocolul uterin în cazuri normale și patologice*, București, 1969.
522. COTARIU DITA, *Cercetarea comparativă a unor enzime musculare în seria vertebratelor*, București, 1971.
523. GHEORGHE VICTORIA, *Aspecte ale biochimismului semințelor în timpul perioadei de iarovizare și stimulare*, București, 1957.
524. GHEȚIE V., *Cercetări asupra unor proteine vegetale*, București, 1959.
525. IORDACHE CORINA, *Relațiile dintre biochimismul fosfagenului și excitabilitatea musculară*, București, 1965.
526. MEDEȘAN C., *Interrelații dintre unele substanțe macroergice și glicoliza din mușchii striați perfuzați*, București, 1972.
527. MOLDOVEANU NATALIA, *Metabolismul compușilor adenozinfosforici din mușchi*, București, 1969.
528. SCHELL H.D., *Interacțiunea proteinelor serice și musculare în unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben*, București, 1965.
529. ȘERBAN M., *Cercetări în domeniul proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie*, București, 1963.
530. TĂNĂSESCU D., *Participarea sistemului glicolitic în metabolismul muscular*, București, 1967.

INDEX DE AUTORI[1]

ALEXANDRESCU VICTORIA (GHEORGHE VICTORIA), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 96, 97, 217, 218, 305, 510, 514, 515, 523.

ARNET LIA, 28, 29, 30, 198, 199, 200, 329.

BENȚIA TR., 340, 417, 418, 432, 519.

BOTOȘENEANU LILICA, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 91, 201, 202, 203, 215, 214, 514, 515.

BUZILĂ LUCIA (CRISTEA LUCIA), 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 132, 144, 210, 250, 265.

CĂLIN IOANA vezi *HAGIMA-CĂLIN IOANA*

CÂRSTEANU MIOARA, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 85, 86, 204, 205, 206, 248, 310, 341, 437, 514, 515, 521.

CILIEVICI DOINA vezi *ONICĂ DOINA*

COMOROȘAN S., 207.

CORNOIU IRINA (MARINEANU IRINA), 63, 64, 65, 208, 224, 225, 514, 515.

COTARIU DITA, 30, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 209, 319, 320, 321, 322, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 452, 453, 454, 478, 491, 519, 522.

CRISTEA LUCIA vezi *BUZILĂ LUCIA*

DRAGOMIRESCU CORINA vezi *SARMANIOTI CORINA*

ELEFTERESCU VIORICA

(FRUNZETI VIORICA, PANAITIDE VIORICA) 87, 88, 89, 90, 91, 92, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 231, 232, 514, 515.

FRUNZETI VIORICA vezi *ELEFTERESCU VIORICA*

GHEORGHE S. D., 93, 94, 95, 255, 511, 512.

GHEORGHE VICTORIA vezi *ALEXANDRESCU VICTORIA*

GHEȚIE V., 45, 46, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 271, 272, 273, 292, 293, 303, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 358, 361, 374, 455, 456, 457, 458, 470, 485, 492, 493, 494, 500, 501, 502, 504, 505, 506, 507, 524.

[1] Cifrele reprezintă numărul de ordine din lista lucrărilor institutului.

HAGIMA—CĂLIN IOANA, (*CĂLIN IOANA*), 13, 14, 15, 16, 17, 18, 27, 146, 514, 515.

HULEA ȘT. 438, 439, 440, 514, 515, 520.

IORDACHE CORINA, 47, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 219, 220, 221, 222, 305, 401, 459, 513, 519, 525,

MACOVSCHI E., 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 343, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 486, 487, 496, 497, 498, 503, 514, 515.

MARINEANU IRINA vezi *CORNOIU IRINA*

MĂMĂLIGĂ XENIA,, 223, 250, 254, 255, 256.

MEDEȘAN C., 127, 128, 129, 130, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 285, 286, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 419, 422, 482, 511, 512, 526.

MIHĂESCU SILVIA, 123, 124, 131, 132, 135, 245, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 293, 348, 374, 375, 376, 377, 378, 483.

MIHĂILESCU F., 19, 20, 21, 22, 27, 274, 514, 515.

MIHĂILESCU V., 275, 488, 489.

MOLDOVEANU NATALIA, 227, 251, 252, 263, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 306, 420, 421, 422, 519, 527.

MOTAȘ CECILIA (*ȘELARIU CECILIA*), 133, 134, 135, 147, 245, 290, 291, 292, 293, 294, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 484.

MOTEȚ— GRIGORAȘ D., 136, 137, 229, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 403, 404, 500.

MUȘOLAN CONSTANȚA, 230, 304.

ONICĂ DOINA (*CILIEVICI DOINA*), 46, 61, 138, 270, 307, 308, 309.

PANAITIDE VIORICA vezi *ELEFTERESCU VIORICA*

POPOV DOINA, 23, 24, 25, 26, 27, 311, 312, 514, 515.

PRETORIAN CRISTINA, 236, 516.

RĂDULESCU SANDA, 91, 216, 239, 316, 317, 440, 441, 442, 443, 514, 515.

RĂDULESCU TR., 70, 71, 240, 241, 242, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 423, 467.

ROSENZWEIG BIANCA, 200, 243, 329.

SARMANIOTI CORINA (*DRAGOMIRESCU CORINA*), 62, 81, 82, 83, 84, 125, 126, 137, 159, 222, 244, 302, 330, 437, 517.

SCHELL H.D., 47, 94, 95, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 148, 149, 323, 324, 325, 326,

332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 424, 445, 468, 469, 470, 500, 501, 502, 504, 505, 506, 507, 511, 512, 514, 515, 528.

SCOLNIC LORA (*SOICHER LORA*), 242, 322, 326, 327, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 359, 360.

SOICHER LORA vezi *SCOLNIC LORA*

ȘELARIU CECILIA vezi *MOTAȘ CECILIA*

ȘERBAN M., 31, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 256, 313, 314, 315, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 451, 454, 466, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 490, 491, 508, 509, 518, 519, 520, 529.

TĂNĂSESCU D., 252, 264, 287, 288, 289, 306, 331, 349, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 444, 479, 480, 481, 530.

VASU S.S., 35, 36, 37, 160, 245, 248, 317, 328, 411, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 495, 499, 514, 515, 520.

ZAHARIA ODETTE, 249, 250, 251, 445, 446, 447, 448, 449, 450.

ST. CERC. BIOCHIM., 15, 4, 443–444 (1972)

INDEX DE LUCRĂRI PE SPECIALITĂȚI [1]

I. VARIA

2, 28, 29, 30, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 85, 86, 96, 150, 162, 163, 164, 165, 168, 173, 175, 198, 199, 200, 201, 205, 206, 207, 209, 210, 217, 218, 219, 223, 226, 233, 234, 235, 236, 238, 240, 241, 243, 245, 247, 248, 251, 252, 256, 291, 295, 296, 297, 298, 306, 310, 313, 314, 315, 323, 329, 342, 359, 360, 362, 372, 373, 375, 376, 377, 378, 401, 404, 405, 406, 408, 409, 425, 426, 427, 428, 429, 433, 437, 444, 445, 449, 450, 451, 453, 460, 461, 462, 468, 469, 479, 481, 482, 483, 484, 488, 489, 492, 493, 495, 496, 497, 498, 499, 503, 510, 519, 521.

II. BIOCHIMIE MUSCULARĂ

70, 71, 72, 74, 77, 93, 94, 95, 148, 151, 152, 153, 154, 155, 159, 220, 221, 222, 242, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 318, 319, 320, 321, 322, 324, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 349, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 381, 385, 386, 387, 391, 410, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 421, 422, 423, 424, 454, 459, 467, 476, 478, 480, 491, 525, 526, 527, 528.

III. BIOCHIMIE COMPARATĂ

54, 56, 66, 67, 68, 69, 73, 75, 76, 79, 156, 157, 158, 379, 380, 382, 383, 384, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 402, 407, 452, 471, 472, 473, 475, 477, 490, 522, 529, 530.

IV. IMUNOCHIMIE

41, 44, 45, 46, 61, 62, 81, 82, 83, 84, 107, 108, 109, 110, 111, 122, 123, 124, 125, 126, 127 ,128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 138, 140, 141, 142, 144, 145, 147, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 290, 292, 293, 294, 299, 300, 301, 302, 303, 307, 308, 309, 330, 343, 348, 358, 361, 370, 371, 374, 458, 470, 485, 494.

[1] Cifrele reprezintă numărul de ordine din lista lucrărilor institutului.

V. BIOSTRUCTURĂ

63, 64, 65, 87, 88, 172, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 200, 211, 213, 214, 224, 225, 228, 230, 304, 464, 465, 486, 487, 514, 515.

VI. BIOCHIMIA PLANTELOR

1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 40, 42, 43, 47, 89, 90, 91, 92, 97, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 106, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 146, 149, 167, 169, 170, 171, 174, 176, 202, 203, 210, 212, 215, 216, 232, 239, 249, 250, 251, 274, 305, 311, 312, 316, 323, 446, 447, 455, 456, 457, 463, 510, 513, 516, 517, 518, 520, 523, 524.

VII. ACIZI NUCLEICI

33, 36, 37, 90, 160, 304, 317, 430, 432, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 441, 442, 448.

VIII. METODE

31, 32, 52, 53, 55, 78, 80, 81, 82, 92, 102, 105, 112, 117, 125, 128, 132, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 161, 166, 167, 170, 171, 176, 204, 206, 227, 229, 231, 237, 244, 246, 259, 275, 303, 341, 343, 344, 345, 346, 347, 349, 350, 385, 403, 411, 420, 431, 436, 463, 466, 470, 474, 500, 501, 502, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 511, 512.

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca „Viaţa ştiinţifică", în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., „Rcenzii", în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare, etc.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citirea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, sectorul 1.

1973 FEB 7

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

E. MACOVSCHI, **Biostructura**, 1969, 258 p., 18,50 lei.

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici şi virali**, 1966, 375 p. + 8 pl., 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p. + 18 pl., 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 628 p. + 20 pl., 50 lei.

LYDIA-MARIA VAICUM, **Biodegradabilitatea detergenţilor**, 1971, 255 p. + 3 pl., 16 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5—. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 15, Nr. 4, P. 337—444, BUCUREŞTI, DECEMBRIE, 1972

I. P. „Informaţia" — c. 1835

43816

Lei 20.—